

2019

ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

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

ЖУРНАЛ «ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ»

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

ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

январь–март

2019, том 9

№ 1

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
Лоузир 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 Мадагаскара, Антананариву, Мадагаскар

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: Ракитянская Н.В. (Санкт-Петербург)

Редактор перевода: Исаков Д.В., к.м.н. (Санкт-Петербург)

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

Редактор электронной версии: Ерофеева В.С. (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.

Russian Journal of Infection and Immunity (Infektsiya i immunitet)

January–March

2019, volume 9

No. 1

The journal is published with the assistance of the Branch of All-Russian Scientific and Practical Society of Epidemiologists, Microbiologists and Parasitologists for St. Petersburg and Leningrad Region

Editor-in-chief

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

Deputy editor-in-chief

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

Members of editorial board

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

Luis Barbeito PhD, MD (Medicine), Professor, Institute Pasteur de Montevideo, Director, Montevideo, Uruguay

Paul Brey PhD, MD (Biology), Professor, Institute Pasteur du Laos, Director; Laboratory of Medical Entomology and Biology of Disease Vectors, Head, Vientiane, Laos

Charles M. Dozois PhD, MD (Biology), Professor, INRS — Institute Armand Frappier, Director, Quebec, Canada

Alexander L. Gintsburg PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, N.F. Gamaleya Federal Center of Epidemiology and Microbiology, Director, Moscow, Russian Federation

Irina N. Lavrentieva PhD, MD (Medicine), St. Petersburg Pasteur Institute, Head of the Laboratory of Experimental Virology, St. Petersburg, Russian Federation

Yuri V. Lobzin PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Director, St. Petersburg, Russian Federation

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

Dmitry K. Lvov PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, D.I. Ivanovsky Institute of Virology, 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 Madagascar, Director, Antananarivo, Madagascar

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

Assistant editor: Natalia V. Rakitianskaia (St. Petersburg)

Translation editor: Dmitrii V. Isakov (St. Petersburg)

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

Online version editorial manager: Vera S. Erofeeva (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 20.03.2019. Print format 60 x 90 1/8.
Offset printing. Printed sheets 27,5.
Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies).

© Russian Journal of Infection and Immunity =
Infektsiya i immunitet

© North-West Regional Branch of Medical Sciences, 2019

© St. Petersburg Pasteur Institute, 2019

© SPb RAACI, 2019

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

- Долгушин И.И., Мезенцева Е.А., Савочкина А.Ю., Кузнецова Е.К.
НЕЙТРОФИЛ КАК «МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ УСТРОЙСТВО» ИММУННОЙ СИСТЕМЫ 9
- Шестопалов А.В., Дворников А.С., Борисенко О.В., Тутельян А.В.
**ТРЕФОИЛОВЫЕ ФАКТОРЫ – НОВЫЕ МАРКЕРЫ МУКОЗАЛЬНОГО БАРЬЕРА
ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА** 39

Оригинальные статьи

- Тимошичева Т.А., Забродская Я.А., Амосова И.В.
**ГЕКСОН КАК ОСНОВНОЙ БЕЛОК ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ,
ВЫЯВЛЯЮЩИХ АДЕНОВИРУСЫ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ** 47
- Морозова О.В., Сашина Т.А., Епифанова Н.В., Новикова Н.А.
**РАЗЛИЧИЯ В АМИНОКИСЛОТНОМ СОСТАВЕ АНТИГЕННЫХ ЭПИТОПОВ БЕЛКА VP7 РОССИЙСКИХ
РОТАВИРУСОВ С ГЕНОТИПОМ G9 И ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ ROTATEQ, ROTAVAC И ROTARIX** 57
- Лосев И.В., Петухова Г.Д., Исакова-Сивак И.Н., Руденко Л.Г.
**ИММУНОГЕННОСТЬ И ЗАЩИТНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЖИВОЙ И ИНАКТИВИРОВАННОЙ
ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ ВИРУСОВ ГРИППА А (H5N1) ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ
ИХ ДЛЯ ПРАЙМ-БУСТ ИММУНИЗАЦИИ МЫШЕЙ** 67
- Черных Е.Р., Олейник Е.А., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Тыринова Т.В., Старостина Н.М., Останин А.А.
**ИНДУКЦИЯ НСВ-СПЕЦИФИЧЕСКОГО КЛЕТОЧНОГО ОТВЕТА *IN VITRO* ДЕНДРИТНЫМИ КЛЕТКАМИ,
ГЕНЕРИРОВАННЫМИ В ПРИСУТСТВИИ ИНТЕРФЕРОНА- α** 76
- Рубцова Ю.П., Алейник Д.Я., Живцов О.П., Митрофанов В.Н.
**СОЗРЕВАНИЕ *IN VITRO* ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ЗДОРОВЫХ ЛИЦ И ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ
ОСТЕОМИЕЛИТОМ, ВЫЗВАННЫМ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*** 87
- Хохлова О.Е., Ивао Я., Камшилова В.В., Теплякова О.В., Мотова А.И., Дробушевская А.И., Перьянова О.В.,
Винник Ю.С., Поткина Н.К., Здзитовецкий Д.Э., Ямамото Т.
**ВЫЯВЛЕНИЕ РОЛИ МЕТИЦИЛЛИНРЕЗИСТЕНТНЫХ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* И ИХ МОЛЕКУЛЯРНО-
ГЕНЕТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ В РАЗВИТИИ ГНОЙНО-НЕКРОТИЧЕСКИХ ФОРМ СИНДРОМА
ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ** 95
- Генералов С.В., Кравцов А.Л., Кожевников В.А., Гаврилова Ю.К., Абрамова Е.Г., Никифоров А.К.
**ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ ПРИ АНАЛИЗЕ ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ АНТИРАБИЧЕСКИХ
СЫВОРОТОК И ИММУНОГЛОБУЛИНА** 107
- Савченко А.А., Борисов А.Г., Черданцев Д.В., Первова О.В., Кудрявцев И.В., Беленюк В.Д.
**ОСОБЕННОСТИ ФЕНОТИПА Т-ЛИМФОЦИТОВ В ДИНАМИКЕ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОГО ПЕРИОДА
У БОЛЬНЫХ ПЕРИТОНИТОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИСХОДА ЗАБОЛЕВАНИЯ** 115
- Чуйкин С.В., Акмалова Г.М., Мирсаяпова И.А., Ронь Г.И., Чернышева Н.Д., Хайруллина Р.М.
**ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО СТАТУСА У БОЛЬНЫХ С РАЗНЫМИ КЛИНИЧЕСКИМИ ФОРМАМИ
КРАСНОГО ПЛОСКОГО ЛИШАЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ РТА** 128
- Клюева С.Н., Бугоркова С.А., Гончарова А.Ю., Кравцов А.Л., Кудрявцева О.М., Санджиев Д.Н., Конушева С.В.,
Савченко С.П., Хасыкова Б.А., Агапов Б.Л., Щербаклова С.А.
**КОМПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ КОРРЕЛЯЦИОННЫХ ВЗАИМОСВЯЗЕЙ МЕЖДУ ПОКАЗАТЕЛЯМИ
ГУМОРАЛЬНОГО И КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА У ЛИЦ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ ПРОТИВ ЧУМЫ** 135
- Послова Л.Ю., Алексеев А.Б., Сергеева А.В., Ковалишена О.В., Шкарин В.В., Сенягина Н.Е.,
Бруснигина Н.Ф., Бутина Т.Ю.
**ОЦЕНКА ЧАСТОТЫ И УСЛОВИЙ ИНФИЦИРОВАНИЯ ВИРУСАМИ TTV И HGV У ДЕТЕЙ С ВПЕРВЫЕ
УСТАНОВЛЕННЫМ ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ ЛЕЧЕНИЯ** 147

Терлецкий А.В., Ахмерова Л.Г., Евтушенко Е.В.

КРОВЕПАЗИТАРНАЯ ИНФЕКЦИЯ КАК ПРИЧИНА ВОЗНИКНОВЕНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ И ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ ОБРАЗОВАНИЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА	155
---	------------

Куличенко А.Н., Прислегина Д.А.

КРЫМСКАЯ ГЕМОРРАГИЧЕСКАЯ ЛИХОРАДКА: КЛИМАТИЧЕСКИЕ ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗМЕНЕНИЙ АКТИВНОСТИ ПРИРОДНОГО ОЧАГА НА ЮГЕ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ	162
--	------------

Беспятых Ю.А., Виноградова Т.И., Маничева О.А., Заболотных Н.В., Догондзе М.З., Витовская М.Л., Гуляев А.С., Журавлев В.Ю., Шитиков Е.А., Ильина Е.Н.

ВИРУЛЕНТНОСТЬ <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ГЕНОТИПА BEIJING В УСЛОВИЯХ <i>IN VIVO</i>	173
---	------------

Базыкина Е.А., Туркутюков В.Б., Троценко О.Е., Котова В.О., Балахонцева Л.А., Бутакова Л.В., Варнавская Л.В., Фоменко В.В., Чечулина М.А., Крапивкин А.И., Зиньковская С.В., Будай Г.И., Янович О.А., Ломакина Е.А., Лукина З.И.

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСА ГЕПАТИТА В У ВИЧ-ПОЗИТИВНЫХ ЛИЦ В ДАЛЬНЕВОСТОЧНОМ РЕГИОНЕ	183
--	------------

Иванова М.В., Миндлина А.Я., Полибин Р.В., Ушанова А.В.

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВНУТРИУТРОБНЫХ И ВНУТРИБОЛЬНИЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ НОВОРОЖДЕННЫХ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ	193
---	------------

Краткие сообщения

Кузютина Ю.А., Захарова И.Б., Викторов Д.В.

КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ <i>E. COLI</i> – ПРОДУЦЕНТОВ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИГЕНОВ <i>BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI</i>	203
---	------------

Полтавченко А.Г., Нечитайло О.В., Филатов П.В., Ерш А.В.

ОЦЕНКА МЕТОДА МУЛЬТИПЛЕКСНОГО ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВОЗБУДИТЕЛЯМ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ	209
--	------------

Рецензия	216
-----------------------	------------

Правила для авторов	217
----------------------------------	------------

Авторский указатель	220
----------------------------------	------------

Предметный указатель	220
-----------------------------------	------------

CONTENTS

Reviews

- Dolgushin I.I., Mezentseva E.A., Savochkina A.Yu., Kuznetsova E.K.*
NEUTROPHIL AS A MULTIFUNCTIONAL RELAY IN IMMUNE SYSTEM 9
- Shestopalov A.V., Dvornikov A.S., Borisenko O.V., Tutelyan A.V.*
TREFOIL FACTORS – NEW MARKERS OF GASTROINTESTINAL MUCOSAL BARRIER 39

Original articles

- Timoshicheva T.A., Zabrodskaya Ya.A., Amosova I.V.*
HEXON-BASED SCAFFOLD FOR GENERATION OF DIAGNOSTIC MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST DIVERSE ADENOVIRUS TYPES 47
- Morozova O.V., Sashina T.A., Epifanova N.V., Novikova N.A.*
DIFFERENCES IN THE AMINO ACID COMPOSITION OF THE ANTIGEN EPITOPES OF THE VP7 PROTEIN OF RUSSIAN ROTAVIRUSES WITH THE G9 GENOTYPE AND THE VACCINE STRAINS ROTATEQ, ROTAVAC, AND ROTARIX 57
- Losev I.V., Petukhova G.D., Isakova-Sivak I.N., Rudenko L.G.*
IMMUNOGENICITY AND PROTECTIVE EFFICACY OF PRIME-BOOST IMMUNIZATION IN MICE VACCINATED WITH LIVE AND INACTIVATED INFLUENZA A (H5N1) VACCINES 67
- Chernykh E.R., Oleynik E.A., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Tyrinova T.V., Starostina N.M., Ostanin A.A.*
INDUCTION OF HCV-SPECIFIC CELL RESPONSE *IN VITRO* BY DENDRITIC CELLS GENERATED WITH INTERFERON- α 76
- Rubtsova J.P., Aleynik D.Ya., Zhivtsov O.P., Mitrofanov V.N.*
***IN VITRO* DENDRITIC CELL MATURATION ISOLATED FROM HEALTHY PEOPLE AND PATIENTS WITH STAPHYLOCOCCUS AUREUS-CAUSED CHRONIC OSTEOMYELITIS** 87
- Khokhlova O.E., Iwao Y., Kamshilova V.V., Teplyakova O.V., Motova A.I., Drobushhevskaya A.I., Peryanova O.V., Vinnik Yu.S., Potkina N.K., Zdzitowiecki D.E., Yamamoto T.*
A ROLE OF METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS STRAINS AND RELATED MOLECULAR GENETIC FEATURES IN DEVELOPING PURULENT-NECROTIC FORMS OF THE DIABETIC FOOT SYNDROME 95
- Generalov S.V., Kravtsov A.L., Kozhevnikov V.A., Gavrilova Yu.K., Abramova E.G., Nikiforov A.K.*
FLOW CYTOMETRY FOR THE ANALYSIS OF VIRUS-NEUTRALIZING ACTIVITY OF ANTIRABIES SERUM AND IMMUNOGLOBULIN DRUG 107
- Savchenko A.A., Borisov A.G., Cherdancev D.V., Pervova O.V., Kudryavcev I.V.*
PECULIARITIES OF THE PHENOTYPE OF T-LYMPHOCYTES IN THE DYNAMICS OF THE POSTOPERATING PERIOD IN PATIENTS WITH PERITONITE DEPENDING ON THE OUTCOME OF DISEASE 115
- Chuykin S.V., Akmalova G.M., Mirsayapova I.A., Ron G.I., Chernysheva N.D., Khairullina R.M.*
FEATURES OF IMMUNE STATUS IN PATIENTS WITH VARIOUS CLINICAL FORMS OF ORAL LICHEN PLANUS 128
- Klyueva S.N., Bugorkova S.A., Goncharova A.Y., Kravtsov A.L., Sandzhiev D.N., Konusheva S.V., Savchenko S.P., Khasykova B.A., Agapov B.L., Shcherbakova S.A.*
COMPLEX ANALYSIS OF CORRELATION INTERRELATIONS BETWEEN INDICATORS OF HUMORAL AND CELLULAR IMMUNITY IN PERSONS VACCINATED AGAINST PLAGUE 135
- Poslova L.Yu., Alekseev A.B., Sergeeva A.V., Kovalishena O.V., Shkarin V.V., Senagina N.E., Brusnigina N.F., Butina T.Yu.*
TREATMENT PHASE-SPECIFIC FREQUENCY AND CONDITIONS FOR DEVELOPING TTV AND HGV INFECTION IN CHILDREN WITH NEW ONSET ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA 147
- Terletsky A.V., Akhmerova L.G., Evtushenko E.V.*
BLOOD PARASITE INFECTION CAUSING INFLAMMATORY REACTIONS AND BENIGN FORMATIONS IN HUMAN THYROID GLAND 155

Kulichenko A.N., Prislegina D.A.

CLIMATIC PREREQUISITES FOR CHANGING ACTIVITY IN THE NATURAL CRIMEAN-CONGO HEMORRHAGIC FEVER FOCUS IN THE SOUTH OF THE RUSSIAN FEDERATION	162
---	------------

Bespyatykh J.A., Vinogradova T.I., Manicheva O.A., Zabolotnykh N.V., Dogonadze M.Z., Vitovskaya M.L., Guliaev A.S., Zhuravlev V.Yu., Shitikov E.A., Ilina E.N.

IN VIVO VIRULENCE OF BEIJING GENOTYPE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS	173
---	------------

Bazykina E.A., Turkutyukov V.B., Trotsenko O.E., Kotova V.O., Balakhontseva L.A., Butakova L.V., Varnavskaya L.V., Fomenko V.V., Chechulina M.A., Krapivkin A.I., Zinkovskaya S.V., Budai G.I., Yanovich O.A., Lomakina E.A., Lukina Z.I.

PREVALENCE AND MOLECULAR-GENETIC CHARACTERISTICS OF HEPATITIS B VIRUS IN HIV-POSITIVE INDIVIDUALS AT THE FAR EASTERN FEDERAL DISTRICT	183
--	------------

Ivanova M.V., Mindlina A.Ya., Polibin R.V., Ushanova A.V.

RUSSIA-WIDE EPIDEMIOLOGICAL SURVEY OF CONGENITAL AND NOSOCOMIAL INFECTIONS IN NEWBORNS	193
---	------------

Short communications

Kuzyutina Yu.A., Zakharova I.B., Viktorov D.V.

ENGINEERING E. COLI RECOMBINANT STRAINS FOR HIGH YIELD PRODUCTION OF BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI SPECIFIC ANTIGENS	203
---	------------

Poltavchenko A.G., Nechitaylo O.V., Filatov P.V., Ersh A.V.

A VERIFIED MULTIPLEXED IMMUNOASSAY FOR DETECTING ANTIBODIES AGAINST INFECTIOUS PATHOGENS	209
---	------------

Book Review	216
--------------------------	------------

Instructions to Authors	217
--------------------------------------	------------

Author index	220
---------------------------	------------

Subject index	220
----------------------------	------------

НЕЙТРОФИЛ КАК «МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ УСТРОЙСТВО» ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

И.И. Долгушин¹, Е.А. Мезенцева¹, А.Ю. Савочкина¹, Е.К. Кузнецова²

¹ ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Челябинск, Россия

² ФГБОУ ВО Оренбургский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Оренбург, Россия

Резюме. За последние 2–3 десятилетия благодаря использованию новых технологий было значительно расширено представление о спектре функциональных возможностей нейтрофильных гранулоцитов. Детально изучен их эффекторный потенциал в отношении инфекционных агентов, включающий фагоцитоз, продукцию активных форм кислорода и азота, дегрануляцию с высвобождением многочисленных ферментов и антимикробных пептидов, образование внеклеточных ловушек. При этом установлено, что многие из тех факторов, которые нейтрофилы используют для прямого уничтожения патогенов, оказывают регулирующее влияние в отношении других клеток иммунной системы и самих нейтрофилов. Кроме того, при активации нейтрофилы способны синтезировать ряд биологически активных молекул *de novo*. Реализация иммунорегуляторного влияния нейтрофилов в отношении макрофагов, дендритных клеток, Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов может происходить как путем прямого межклеточного контакта, так и опосредовано через продукцию цитокинов и других биологически активных медиаторов. Амбивалентное — как хелперное, так и супрессорное — воздействие нейтрофилов на клетки иммунной системы свидетельствует об их важной роли как в условиях гомеостаза, так и при различных видах патологии, в частности при развитии злокачественных опухолей. Способность нейтрофильных гранулоцитов проявлять разнообразные, порой даже антагонистические варианты воздействия на иммунные клетки и клетки других тканей, свидетельствует об их функциональной пластичности и, вероятно, гетерогенности. При этом вектор активности, проявляемой нейтрофилами, во многом зависит от того микроокружения, в котором они оказываются, выходя из периферического кровотока. Традиционно считаясь индукторами воспалительной реакции, нейтрофилы демонстрируют способность параллельно включать механизмы, способствующие ограничению и разрешению воспаления. Благодаря интравитальной микроскопии в моделях на животных установлена способность нейтрофилов возвращаться в кровоток после выхода во внесосудистое пространство, что бросает вызов классической концепции однонаправленности миграции нейтрофилов из сосудистого русла в ткани. Также получены доказательства, что в определенных условиях нейтрофилы могут проявлять себя как антиген-презентирующие клетки по отношению к Т-лимфоцитам и рекрутироваться из сайтов воспаления в дренирующие лимфатические узлы. И хотя многие данные получены в условиях *in vitro* или в моделях на животных и поэтому требуют дополнительного изучения и подтверждения, однозначно можно констатировать, что влияние нейтрофилов не ограничивается рамками системы врожденного иммунитета.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, иммунорегуляторные функции, воспаление, адаптивный иммунитет, рак, тумор-ассоциированные нейтрофилы.

Адрес для переписки:

Савочкина Альбина Юрьевна
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64,
ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России.
Тел.: 8 (912) 772-58-06.
E-mail: alina7423@mail.ru

Contacts:

Albina Yu. Savochkina
454092, Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovskogo str., 64,
South-Ural State Medical University.
Phone: +7 (912) 772-58-06.
E-mail: alina7423@mail.ru

Библиографическое описание:

Долгушин И.И., Мезенцева Е.А., Савочкина А.Ю., Кузнецова Е.К.
Нейтрофил как «многофункциональное устройство» иммунной
системы // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 1. С. 9–38.
doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-9-38

Citation:

Dolgushin I.I., Mezentseva E.A., Savochkina A.Yu., Kuznetsova E.K.
Neutrophil as a multifunctional relay in immune system // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 1,
pp. 9–38. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-9-38

NEUTROPHIL AS A MULTIFUNCTIONAL RELAY IN IMMUNE SYSTEM

Dolgushin I.I.^a, Mezentseva E.A.^a, Savochkina A.Yu.^a, Kuznetsova E.K.^b

^a South-Ural State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russian Federation

^b Orenburg State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Orenburg, Russian Federation

Abstract. Over the last two or three decades, a concept regarding functional capacities of neutrophilic granulocytes has been remarkably extended owing to new technologies. Neutrophil-related effector potential against infectious agents, including phagocytosis, production of reactive oxygen and nitrogen species, degranulation coupled with the released multiple enzymes and antimicrobial peptides, and the extracellular trap formation have been studied in detail. In particular, it was found that many of the factors used by neutrophils to directly destroy pathogens also exert regulatory effects on other immune cells as well as on neutrophils in an autocrine manner. In addition, activated neutrophils are able to de novo synthesize a range of biologically active molecules. Neutrophil-related immunoregulatory effects on macrophages, dendritic cells, T-lymphocytes and B-lymphocytes may be mediated both via direct intercellular contacts and indirectly through production of cytokines and other biologically active mediators. Ambiguous proactive and suppressive neutrophil-related effects on immune cells evidence about their important role played both in homeostasis and diverse pathologies, particularly in developing malignant tumors. Diverse, even opposing impact exhibited by neutrophilic granulocytes on immune cells and cells in non-lymphoid tissues, point at their functional plasticity and, probably, heterogeneity. Upon that, modality of effects elicited by neutrophils largely depends on surrounding microenvironment while they exit from the circulation. Widely considered as an inflammatory response inducer, neutrophils are able to simultaneously trigger mechanisms facilitating restriction and resolution of inflammatory reaction. Using intravital microscopy in animal models, it allowed to discover that neutrophils are able to re-enter circulation after exiting into the extravascular space, thereby challenging a classical concept about a unidirectional neutrophil migration from the blood vessels to body tissue. In addition, evidence that neutrophils can serve as antigen-presenting cells for T cells under certain conditions and are recruited from inflammatory sites to draining lymph nodes were also obtained. Although a body of the data were obtained *in vitro* or in animal models, which therefore require to be further examined and verified, it may be unequivocally acknowledged that a neutrophil-related impact is not only limited to innate immunity.

Key words: neutrophil granulocytes, immunoregulatory functions, inflammation, adaptive immunity, cancer, tumor-associated neutrophils.

Во многих статьях последних лет, посвященных нейтрофильным гранулоцитам, отмечается, что взгляд на эти клетки претерпел изменения и значительно расширился за последние два десятилетия. Уникальная роль нейтрофилов заключается, безусловно, не только в важных эффекторных функциях защиты от инфекционных агентов. На сегодняшний день нет сомнений, что нейтрофильные гранулоциты участвуют в инициации, модуляции, регулировании и разрешении реакций врожденного и адаптивного иммунитета через прямые (путем межклеточного контакта) и опосредованные (через продукцию цитокинов и других биологически активных медиаторов) механизмы. Кроме того эти клетки играют важную роль в репарации тканей и поддержании тканевого гомеостаза. При этом отмечается функциональная и фенотипическая гетерогенность и пластичность этих клеток [5, 6, 7, 39, 95, 117, 118, 155, 164, 185, 192, 203, 231].

Понимание физиологии и функциональной роли нейтрофилов расширилось, в том числе благодаря новым технологиям и методам исследования *in vitro* и *in vivo*: использование трансгенных и генетически нокаутных (genetic knock-out) животных; блокирующих, истощающих, меченых антител; многоцветной проточной цитофлуориметрии, клеточных сортеров и др. Огромный вклад в улуч-

шение понимания и детализацию биологии нейтрофилов внесла прижизненная микроскопия (intravital microscopy) [102, 231]. Данная технология помогает визуализировать разные типы клеток и проследить за реализацией их функций в режиме реального времени в организме живого животного [143, 196]. Благодаря прижизненной микроскопии удалось изучить процессы рекрутирования, адгезии, миграции нейтрофилов, более детально охарактеризовать эффекторные механизмы, такие как фагоцитоз и образование нейтрофильных внеклеточных ловушек (neutrophil extracellular traps — NETs), исследовать взаимодействия нейтрофилов с другими клетками, тканями, микроорганизмами [94, 114, 161, 242]. Однако следует учитывать, что данные, полученные при исследовании *ex vivo* или в моделях животных, например, мышей или рыб Данио-рерио (zebrafish), не всегда могут абсолютно идентично отражать механизмы и процессы, развивающиеся в организме человека.

В настоящем обзоре мы хотим сфокусировать внимание на данных последних лет, отражающих взаимоотношения нейтрофилов с другими клетками иммунной системы (макрофагами, дендритными клетками, Т- и В-лимфоцитами) и демонстрирующих регуляторные функции нейтрофилов в развитии воспаления и иммунного ответа.

Нейтрофилы, моноциты/макрофаги и острое воспаление

По классическим канонам воспаления нейтрофилы первыми прибывают в ткани при их повреждении (стерильная травма) или при микробной инвазии. Рекрутированию нейтрофилов из кровотока в очаг способствуют, в первую очередь, резидентные тканевые макрофаги, которые активируются при распознавании патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (pathogen-associated molecular patterns — PAMPs) или молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением собственных клеток и тканей (damage-associated molecular patterns — DAMPs) [9, 13, 202]. После микробного заражения и при стерильной травме активированные макрофаги продуцируют хемоаттрактанты для нейтрофилов, такие как CXCL1 (KC), CXCL2 (macrophage-inflammatory protein-2 — MIP-2), CXCL8 (IL-8) [52, 171]. Кроме того, в макрофагах происходит активация Nlrp3 инфламмасом, результатом чего является образование мощного провоспалительного цитокина IL-1 β . IL-1 β способствует повышению экспрессии молекул адгезии на поверхности эндотелия и хемокинов, в том числе KC и MIP-2 [146, 168]. Результатом действия перечисленных факторов является быстрая миграция нейтрофилов в очаг заражения/травмы. Прибыв на место, нейтрофилы индуцируют вторую волну воспалительной реакции. Они выделяют хемоаттрактантные факторы, такие как катепсин G и азуроцидин (CAP37), которые участвуют в рекрутировании моноцитов [37, 207], индуцируют изменения в структуре цитоскелета эндотелиальных клеток, тем самым способствуя трансмиграции моноцитов [78]. Вышедшие в ткани моноциты трансформируются в макрофаги и становятся полноценными участниками воспалительного процесса. При этом они продуцируют такие цитокины, как гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) и фактор некроза опухолей альфа (TNF α), способствуя увеличению срока жизни нейтрофилов и давая им, тем самым, реализовать свой эффекторный потенциал [208, 217], проявляющийся в фагоцитозе, высвобождении содержимого гранул, продукции активных форм кислорода и образовании внеклеточных ловушек [117]. Таким образом, нейтрофилы и макрофаги становятся «братьями по оружию» и выступают «единым фронтом» в борьбе с флогогенным фактором.

Как стало известно в последние годы, в зависимости от тканевого микроокружения ма-

крофаги могут приобретать M1 или M2 фенотип, что обуславливает их провоспалительную (M1) или противовоспалительную (M2) активность [10, 87, 142]. Провоспалительные макрофаги экспрессируют индуцибельную NO-синтазу и CD40 и продуцируют TNF α и IL-6, тогда как противовоспалительные макрофаги экспрессируют аргиназу I и CD206 и продуцируют трансформирующий фактор роста бета (transforming growth factor — TGF- β) и IL-10 [129, 241]. Во время начальных стадий инфекционного воспаления нейтрофилы индуцируют M1 фенотип макрофагов, способствуя их провоспалительной активности. Одним из механизмов, с помощью которых нейтрофилы опосредуют подобную поляризацию макрофагов, является высвобождение ими азуроцидина [160].

Однако выраженность и продолжительность острого воспаления должна жестко контролироваться, чтобы, с одной стороны, привести к устранению причинного фактора (например, уничтожению и элиминации инфекционного агента), с другой стороны, не нанести значительного ущерба окружающим тканям, не перейти в хронический процесс, не вызвать развитие аутоиммунного поражения.

Разрешение острого воспаления включает в себя несколько этапов: 1) прекращение инфильтрации очага воспаления нейтрофильными гранулоцитами; 2) восстановление сосудистой проницаемости; 3) гибель нейтрофилов (главным образом путем апоптоза); 4) нефлогенное привлечение в очаг воспаления моноцитов; 5) фагоцитоз макрофагами апоптотических нейтрофилов и тканевого детрита [2].

Активированные нейтрофилы с самых ранних стадий развития воспаления выделяют эктосомы, которые обладают мощным противовоспалительным эффектом. Они представляют собой везикулы с цитозолем, диаметром 50–200 нм, экспонирующие фосфатидилсерин на внешней поверхности мембраны. Связываясь с помощью фосфатидилсерина с мембраной макрофагов, эти микрочастицы усиливают продукцию TGF- β и подавляют образование IL-10, IL-8, TNF α активированными макрофагами, то есть вызывают «перепрограммирование» в сторону противовоспалительного фенотипа [59, 76].

Одним из механизмов разрешения острого воспаления является апоптоз нейтрофилов с последующим фагоцитозом тканевыми макрофагами (эффероцитоз) [83, 169]. Аннексин A1 (AnxA1), белок, продуцируемый нейтрофилами, усиливает этот процесс, увеличивая фагоцитарную способность макрофагов, одновременно потенцируя апоптоз соседних нейтрофилов и предотвращая трансэндотелиальную миграцию нейтрофилов [191, 209]. Макрофаги

распознают апоптотические клетки, в том числе, по наличию на их поверхности фосфатидилсерина — сигнала «съешь меня» [169, 191]. Кроме того, AnxA1, являясь хемоаттрактантом для моноцитов, усиливает нефлогенное рекрутирование последних в ткани с последующей дифференцировкой в макрофаги, которые поглощают и уничтожают оставшиеся в тканях нейтрофилы [37]. Фагоцитоз апоптотических нейтрофилов способствует трансформации макрофагов в сторону M2 фенотипа. В таких макрофагах подавляется продукция целого ряда провоспалительных цитокинов, в том числе IL-23, вовлеченного в гранулоцитопоз, тогда как секреция TGF- β 1, важного супрессорного цитокина, и простагландина E₂ (PGE₂) увеличивается [66, 214]. Кроме того, у макрофагов, захвативших апоптотические нейтрофилы, снижается фагоцитарная способность по отношению к другим объектам, уменьшается продукция NO и H₂O₂. Подобное супрессорное влияние фагоцитированных макрофагами апоптотических нейтрофилов может быть связано с изменением уровня внутриклеточного Ca²⁺ за счет нейтрофильного кальций-связывающего белка S100A9 (MRP-14) [54].

Эффероцитоз апоптотических нейтрофилов также стимулирует в макрофагах биосинтез липидных медиаторов с противовоспалительным потенциалом, таких как липоксины и резольвины [51]. Последние предотвращают активацию и трансэндотелиальную миграцию нейтрофилов [199], блокируют их функциональный ответ на воспалительные стимулы путем ингибирования активации ядерного фактора «каппа-би» (NF- κ B) и уменьшают образование супероксид-аниона и провоспалительных цитокинов [2, 22], а также способствуют фагоцитозу макрофагами апоптотических нейтрофилов [195]. Кроме того, было показано, что нейтрофилы способны менять собственный профиль липидных медиаторов в зависимости от характера микроокружения и стадии воспаления. Так, прибывая в очаг воспаления и в начале образуя провоспалительные липидные медиаторы типа лейкотриена B₄, в течение нескольких часов нейтрофилы переключают метаболизм арахидоновой кислоты на продукцию липоксинов, резольвинов и протектинов, в очередной раз демонстрируя способность к самоограничению и способствуя разрешению воспаления [141, 198].

Еще один тип клеточной гибели, характерный для нейтрофилов, связан с их способностью к NETs и называется нетоз (NETosis) [18]. Было установлено, что макрофаги человека *in vitro* могут активно захватывать NETs путем эндоцитоза, чему способствует предварительная деградация NETs ДНКазой 1, с последую-

щей утилизацией в лизосомах. При этом интернализация NETs не приводит к индукции синтеза провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, TNF α , IFN α , также как и противовоспалительного IL-10 [68]. Однако при одновременной инкубации макрофагов с липополисахаридом (LPS) и NETs (что приближает условия к тем, которые имеют место *in vivo* при микробном воспалении) наблюдается значительный рост продукции провоспалительных IL-1 β , IL-6, TNF α , причем в гораздо большей степени, чем при изолированной стимуляции макрофагов LPS. Основываясь на этих наблюдениях, авторы предположили, что NETs, нагруженные бактериями, вызывают более сильный провоспалительный ответ в соседних моноцитах/макрофагах, чем только бактерии, что позволяет иммунной системе формировать более надежный и продолжительный ответ против вторгшихся патогенов [68].

В более поздних исследованиях было подтверждено, что человеческие макрофаги могут поглощать NETs *in vitro* [154]. Данная способность была зафиксирована и для M1, и для M2 макрофагов. Однако последствия влияния NETs отличались в зависимости от фенотипа макрофагов. Так, после взаимодействия NETs с M2 макрофагами в супернатантах последних выявлялся широчайший спектр провоспалительных цитокинов и хемокинов: TNF α , IFN γ , IL-8, MIF, CCL1, CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CCL5 (RANTES), CXCL1, CXCL10 и CXCL12. Напротив, секреция флогенных факторов M1 макрофагами после инкубации с нейтрофильными внеклеточными ловушками была ограничена, но при этом наблюдалась деконденсация хроматина и увеличение высвобождения из M1 макрофагов собственной ДНК. Во внеклеточной ДНК M1 макрофагов был обнаружен цитруллинированный гистон 3, и процесс высвобождения ДНК происходил при участии фермента пептидил-аргинин деиминазы 4 (peptidyl-arginine deiminase 4 — PAD-4). Количество внеклеточной ДНК M1 макрофагов достигало пика через 3–4 ч инкубации с NETs и затем постепенно уменьшалось, исчезая через 24 ч за счет возможного действия каспаза-активированной ДНКазы макрофагов. Из полученных данных авторы сделали следующие выводы. Влияние NETs зависит от фенотипа макрофагов и времени воздействия. С одной стороны, воздействие NETs увеличивает продукцию провоспалительных цитокинов и хемокинов M2 макрофагами, что усиливает защиту от микроорганизмов; этому также способствует высвобождение ДНК M1 макрофагами, поскольку ДНК сама может являться антимикробным компонентом, как было отмечено в исследованиях NETs

[86]. С другой стороны, М1 макрофаги через некоторое время сами же осуществляют клиренс внеклеточной ДНК, что опять таки индуцируется NETs [154].

В течение последних лет появились публикации, в которых сообщалось еще об одном механизме, который, возможно, участвует в резолюции острого воспаления. Это способность нейтрофилов возвращаться в кровотоки после выхода во внесосудистое пространство, что бросает вызов классической концепции однонаправленности миграции нейтрофилов из сосудистого русла в ткани. Фактически, обратная миграция нейтрофилов была впервые визуализирована *in vivo* с помощью прижизненной микроскопии на модели рыб Даниорио в 2006 г. Нейтрофилы этих рыб имеют ту же морфологию, поведение и функции, что и нейтрофилы млекопитающих. При этом авторы указали на возможную роль этого феномена в разрешении острого воспаления [144]. В недавних работах на модели этих рыб было показано, что ключевым медиатором во взаимодействиях нейтрофилов и макрофагов при разрешении посттравматического воспаления *in vivo* является простагландин E_2 (PGE_2), который выделяется из макрофагов при фагоцитозе ими апоптотных нейтрофилов [132]. Повышение концентрации PGE_2 через активацию рецепторов на мембране нейтрофилов и макрофагов ингибирует транслокацию фермента 5-липоксигеназы из цитоплазмы в ядро, подавляя, тем самым, синтез в клетках мощных провоспалительных медиаторов лейкотриенов и переключая метаболизм арахидоновой кислоты в сторону синтеза противовоспалительных липоксинов [122]. В свою очередь липоксины, в частности липоксин A4 (LXA4), усиливают обратную миграцию нейтрофилов из очага воспаления, способствуя, тем самым, его разрешению [132].

Механизмы обратной миграции нейтрофилов изучали *in vivo* и на мышах [44, 239]. Исследования на модели стерильной травмы (ишемии/реперфузии *m. cremaster*) показали, что обратная миграция нейтрофилов контролируется молекулами адгезии JAM-C, экспрессируемыми веноулярными эндотелиальными клетками в местах межклеточных соединений. Вероятность и частота обратной миграции нейтрофилов в условиях стерильной травмы повышается при снижении экспрессии и/или функциональной активности JAM-C, а также при ее фармакологической блокаде или генетической делеции [239]. Было установлено, что основным медиатором, вызывающим снижение экспрессии JAM-C в межклеточных контактах эндотелиальных клеток посткапиллярных венул в условиях стерильной травмы, яв-

ляется липидный хемоаттрактант нейтрофилов лейкотриен B4 (LTB4). LTB4 стимулирует дегрануляцию и высвобождение нейтрофилами фермента эластазы, которая вызывает протеолитическое расщепление JAM-C и позволяет, таким образом, возвращаться нейтрофилам из тканей в кровотоки [44]. Однако авторами, изучающими обратную миграцию нейтрофилов в условиях ишемии/реперфузии на мышах, была подчеркнута негативная роль этого феномена в связи со способностью таких нейтрофилов вызывать диссеминацию и генерализацию воспаления. Было установлено, что нейтрофилы, выходящие из первоначального очага воспаления (например, *m. cremaster*) в кровотоки, имеющие фенотип ICAM-1^{hi} и обладающие мощным провоспалительным потенциалом в виде большого количества активных форм кислорода (reactive oxygen species — ROS), через некоторое время выявляются в микроциркуляторном русле легких и вызывают воспаление тканей легкого [44, 239]. Роль JAM-C как ключевого регулятора обратной миграции нейтрофилов была подтверждена в исследованиях *in vivo* и на других моделях воспаления, например, при остром панкреатите. При этом также было установлено, что обратно мигрирующие нейтрофилы вызывают генерализацию воспаления с формированием острого респираторного дистресс-синдрома (acute lung injury) у этих животных [240].

Первые исследования обратной миграции нейтрофилов человека в 2006 г. через эндотелиальный монослой в условиях *in vitro* показали, что ретроградно мигрирующие нейтрофилы имеют определенные фенотипические и биологические характеристики. Они характеризуются сниженным уровнем апоптоза (а значит увеличенным периодом жизни), не способны возвращаться в воспаленные ткани (за счет потери хемокиновых рецепторов CXCR1 и CXCR2 и большей ригидности клеток), генерируют высокие количества H_2O_2 , экспрессируют CD54(ICAM-1)^{hi}CXCR1^{low} в отличие от наивных циркулирующих нейтрофилов (CD54^{low}CXCR1^{hi}) и нейтрофилов, мигрировавших в ткани (CD54^{low}CXCR1^{low}) [33]. Важно, что нейтрофилы с фенотипом обратно-мигрировавших (CD54^{hi}CXCR1^{low}) были обнаружены в периферической крови здоровых доноров в количестве ~0,25% от всех циркулирующих нейтрофилов, а у пациентов с ревматоидным артритом и выраженным атеросклерозом аорты (то есть с хроническими воспалительными заболеваниями) их количество увеличивалось до ~1%. При этом авторы подчеркнули, что обнаруженные ими фенотипические изменения нейтрофилов при обратной миграции являются первым случаем выявления отдельной

субпопуляции нейтрофилов, которая генерируется не при гранулоцитопозе в костном мозге [33].

В более поздних исследованиях было отмечено, что количество нейтрофилов с фенотипом обратного мигрирующих ($CD54^{hi}CXCR1^{low}$) увеличивается в периферической крови пациентов с острым панкреатитом при развитии у них острого респираторного дистресс-синдрома и коррелирует с тяжестью последнего [240].

В 2014 г. группой американских ученых были опубликованы данные о разработке микрофлюидной технологии (microfluidic platform) для изучения миграции нейтрофилов человека [90]. Данная платформа позволяет проводить количественную оценку миграции клеток при воздействии динамических градиентов хемоаттрактантов внутри каналов, что является наиболее приближенным к естественным условиям. В своих исследованиях авторы показали, что девять из десяти нейтрофилов после движения по градиенту хемоаттрактантов могут разворачиваться, меняя направление миграции на противоположное, то есть от хемоаттрактанта. Подобный вариант миграции они назвали «ретротаксис». При этом ретротаксис останавливается, если нейтрофилы осуществляют фагоцитоз. Авторы выдвинули следующую гипотезу: во время стерильного воспаления ретротаксис может ускорять клиренс нейтрофилов и способствовать восстановлению гомеостаза; во время инфекции после фагоцитоза нейтрофилами микробных агентов выключение ретротаксиса может действовать как «механизм безопасности» для предотвращения распространения этих агентов, если их уничтожение внутри фагосом не увенчалось успехом, то есть при незавершенном фагоцитозе [90]. Вместе эти исследования показывают, что обратная миграция нейтрофилов из тканей в кровотоки и, вероятно, ретротаксис являются, с одной стороны, возможными механизмами разрешения локального воспаления; с другой стороны, обратная миграция может приводить к перераспределению активированных нейтрофилов в другие сайты организма, способствуя генерализации воспаления и усиливая тяжесть заболевания.

Подытоживая, можно сказать, что нейтрофилы и макрофаги являются партнерами в развитии острого воспаления в ответ на инфекцию или повреждение тканей. При этом их эффекторный потенциал необходим для успешного устранения флогогенного фактора. Однако с самых ранних стадий развития воспаления начинают работать ограничительные механизмы. При этом нейтрофилы не просто являются пассивным участником этих процессов, а активно включаются в регуляцию разрешения

воспаления, проявляя противовоспалительную активность по отношению к макрофагам и, что может быть важнее, к самим себе, «кладя голову на плаху» ради поддержания тканевого гомеостаза.

Нейтрофилы и дендритные клетки

Дендритные клетки (dendritic cells — DC) представляют собой гетерогенную популяцию клеток врожденного иммунитета. У человека основными типами дендритных клеток являются миелоидные (классические) DC (myeloid DC — mDC или classical DC — cDC) и плазмацитоидные ДК (plasmacytoid DC — pDC) [12, 43]. Миелоидные DC являются основным связующим звеном между врожденным и адаптивным иммунитетом при развитии иммунного ответа [4]. Они демонстрируют типичную древовидную морфологию, экспрессируют в большом количестве CD11c и MHC-II и являются основными антигенпрезентирующими клетками. Плазмацитоидные DC представляют собой клетки округлой формы, экспрессирующие CD11c и MHC-II на низких уровнях; они характеризуются экспрессией B220, Ly6C и PDCA1 (CD317) и секрецией больших количеств IFN типа I [43, 130, 145, 149]. Незрелые дендритные клетки происходят из плюрипотентных стволовых кроветворных клеток и начальную дифференцировку проходят в костном мозге. Клетки-предшественники миелоидных и плазмацитоидных DC выходят из костного мозга, мигрируют в лимфоидные и нелимфоидные ткани, где под действием цитокинов микроокружения превращаются в незрелые DC [38]. Кроме того, при развитии воспаления в нелимфоидных тканях, особенно в соединительнотканых слоях кожи и слизистых, а также в дренирующих лимфоузлах, DC могут развиваться не только из клеток-предшественников, но и из мигрирующих в очаги воспаления моноцитов; такие DC обозначают как моноцитарные (воспалительные) DC (monocyte-derived — moDC) [38, 49, 178, 213, 225]. Они обладают способностью стимулировать наивные $CD4^{+}$ Т-лимфоциты, презентировать антиген $CD8^{+}$ Т-клеткам, продуцировать IL-1, IL-6, TNF α , IL-12, IL-23 [43].

Незрелые DC располагаются в различных органах и тканях, но преимущественно в барьерных — в коже и слизистых. В условиях инфекции и воспаления они поглощают антигенный материал путем пиноцитоза и фагоцитоза. В результате происходит стимуляция незрелых DC сигналами от паттерн-распознающих рецепторов при связывании их с молекулярными структурами, типичными для патогенных микроорганизмов (PAMPs), и через провоспалительные цитокины. Под влиянием этих

стимулов незрелые DC покидают ткани и поступают в региональные лимфатические узлы. В процессе миграции происходит созревание DC, результатом которого является экспрессия высоких уровней МНС-II класса, CD40, CD80, CD86 [38] и специфического набора хемокиновых рецепторов для миграции в Т-зоны лимфоидных органов, что способствует выполнению дендритными клетками их основного назначения — презентации антигенных пептидов наивным Т-лимфоцитам и запуску антигенспецифического иммунного ответа [12, 216].

Влияние нейтрофилов на дендритные клетки имеет две стороны. При активации в очагах инфекции нейтрофилы первым делом секретируют алармины, включая кателицидины, α -дефензины и HMGB1 (high-mobility group protein B1 или амфотерин), а также хемокины CCL3, CCL4, CCL5 и CCL20, которые являются хемоаттрактантами для DC. Кроме того, нейтрофилы выделяют катепсин G и эластазу, которые конвертируют неактивные, неклассические хемокины, такие как прочемерин, в полноценные хемоаттрактантные молекулы (чемерин), что в итоге способствует рекрутированию незрелых DC в очаг [194, 238].

Так, было установлено, что при инвазии *Leishmania major* у мышей нейтрофилы высвобождают хемокин CCL3, вызывающий быстрое рекрутирование DC в очаг инвазии [36]. Активированные нейтрофилы при инвазии *Toxoplasma gondii* у мышей продуцируют хемокины CCL3, CCL4, CCL5, и CCL20, которые привлекают незрелые DC, а также TNF α , который стимулирует созревание DC, приводит к повышению экспрессии CD40, CD86, МНС-II и продукции ими IL-12 и TNF α , что влияет на антигенпрезентирующую функцию дендритных клеток и развитие Th1-зависимого иммунного ответа [25, 26].

Активированные нейтрофилы человека также индуцируют созревание DC, что позволяет последним инициировать пролиферацию Т-клеток и поляризацию их в направлении Т-хелперов 1 типа. Это взаимодействие нейтрофилов и DC может быть обусловлено прямым клеточным контактом за счет связывания DC-специфического лектина SIGN (DC-SIGN) с β_2 -интегрином Mac-1 (CD11b/CD18) нейтрофилов. Интересно, что DC-SIGN взаимодействует только с Mac-1 нейтрофилов, но не других лейкоцитов, главным образом из-за специфических углеводов Lewis^x, которые присутствуют в α M-цепи Mac-1 нейтрофилов. Кроме прямого клеточного контакта, для индукции созревания DC необходим TNF α , продуцируемый активированными нейтрофилами [227].

Также в активации DC участвуют кателицидины, α -дефензины и HMGB1, выделяемые

нейтрофилами непосредственно или в составе NETs [194]. В составе NETs такие компоненты гранул, как кателицидин LL-37, α -дефензины, HMGB1, катепсин G, эластаза находятся в комплексе с ДНК нейтрофилов. Это делает возможным доставку и распознавание ДНК эндосомально-расположенными TLR9 плазмацитойдных DC, что приводит к активации последних и секреции больших количеств IFN α , а также провоспалительных TNF α и IL-6 [75, 119, 194, 205]. Однако защитно-активационные эффекты NETs реализуются в условиях воспаления микробной этиологии. В отсутствие же инфекционного агента образование NETs, а также нарушение их своевременного клиренса, может приводить к гиперстимуляции дендритных клеток, что является патогенетическим фактором в развитии таких аутоиммунных и иммуновоспалительных заболеваний, как системная красная волчанка [75, 119, 148] и псориаз [120].

В совокупности эти данные свидетельствуют о важной роли нейтрофилов в миграции, созревании и активации дендритных клеток. С другой стороны, было установлено, что нейтрофилы могут оказывать ингибирующее влияние на функциональную активность последних.

Как было сказано выше, при дегрануляции активированных нейтрофилов выделяется эластаза — фермент первичных (азурофильных) гранул нейтрофилов из группы сериновых протеаз [1]. Было установлено, что выделение больших количеств эластазы нейтрофилов человека *in vitro* приводит к трансформации незрелых DC в TGF- β 1-продуцирующие DC, что приводит к подавлению пролиферации лимфоцитов и усилению их апоптоза, то есть к развитию иммуносупрессорного эффекта [136]. Позже было обнаружено, что эластаза-трансформированные TGF- β 1-продуцирующие DC в смешанной культуре лимфоцитов *in vitro* индуцируют образование CD4⁺FOXP3⁺ популяции регуляторных Т-клеток (Treg). Таким образом, нейтрофилы, инфильтрирующие ткани, через воздействие на DC, возможно, способствуют формированию толерогенного эффекта и предотвращению развития аутоиммунных процессов [218]. На примере эластазы нейтрофилов можно проследить амбивалентность действия одного и того же фактора. При этом влияние оказываемого эффекта, активирующее или супрессорное, вероятно, может зависеть от природы флогогенного стимула, стадии воспалительного процесса, количества выделившегося вещества и других факторов микроокружения.

Взаимодействие нейтрофилов с DC происходит не только в очаге инфекции или воспаления. Нейтрофилы, инфильтрирующие ткани, спо-

способны мигрировать в дренирующие лимфатические узлы, где они также встречаются с DC [14, 138]. Дегрануляция активированных нейтрофилов приводит к выбросу еще одного компонента первичных (азурофильных) гранул — фермента миелопероксидазы (myeloperoxidase — МРО) [1]. В исследованиях *in vitro* и *in vivo* человеческих и мышиных нейтрофилов было показано, что МРО (через генерацию активных продуктов окисления) ограничивает активность DC и продукцию ими IL-12, подавляет поглощение/процессинг антигена и миграцию в лимфоузлы, ингибируя, таким образом, адаптивный CD4⁺ Т-клеточный иммунный ответ [157].

Роль NETs в регуляции функций и созревания DC тоже может быть не только активационной, но и супрессорной. В условиях *in vitro* было обнаружено, что NETs активированных нейтрофилов человека подавляли LPS-индуцированное созревание moDC, снижая экспрессию поверхностных маркеров HLA-DR, CD40, CD80, CD86 и продукцию цитокинов TNF α , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-23, но не влияли на экспрессию хемокиновых рецепторов CCR5, CCR7, CXCR4 и миграционную способность moDC [21]. Обработанные NETs LPS-индуцированные зрелые moDC демонстрировали снижение способности активировать пролиферацию CD4⁺ Т-лимфоцитов и сдвигали поляризацию в сторону Th2 (с увеличением образования IL-5 и IL-13), подавляя Th1 и Th17, продукцию IFN γ , IL-17, IL-10 [21]. Важно, что IL-13 и IL-4, продуцируемые Th2, влияют на макрофаги, вызывая их трансформацию в сторону фенотипа M2 (противовоспалительного) или «альтернативно активированных макрофагов» [56, 57, 215, 226]. Также установлено, что одновременное воздействие IL-4 и/или IL-13 и апоптозных клеток на макрофаги человека *in vitro* запускает в них экспрессию противовоспалительных генов и генов, ответственных за репарацию тканей [31]. Таким образом, можно предположить, что нейтрофилы, выполнив свою противомикробную функцию и погибая, путем нетоза или апоптоза, помогают другим клеткам «сложить оружие» и перейти к «мирной жизни», бросив все силы на восстановление пострадавших тканей.

Как было отмечено выше, с ранних этапов воспалительной реакции активированные нейтрофилы человека образуют эктосомы с мощной противовоспалительной активностью. Было установлено, что нейтрофильные эктосомы ингибируют LPS-индуцированное созревание moDC, модифицируют их морфологию, уменьшают эндоцитарную активность и увеличивают высвобождение ими TGF- β 1. Кроме того, они уменьшают экспрессию CD40, CD80, CD83, CD86 и HLA-DP DQ DR, ингиби-

руют секрецию IL-8, IL-10, IL-12, TNF α и снижают способность зрелых moDC индуцировать пролиферацию Т-клеток [59].

Также как макрофаги, DC осуществляют эффероцитоз, в том числе и апоптозных и некротизированных нейтрофилов. В условиях *in vitro* было установлено, что поглощение moDC нейтрофилов человека, подвергшихся апоптозу или некрозу, приводит к снижению экспрессии CD40, CD80 и CD86 и способности moDC стимулировать пролиферацию Т-клеток [41].

При внутрикожной инвазии *Leishmania major* у мышей было установлено, что после того, как лейшмании фагоцитировались нейтрофилами, в последних запускалась программа апоптоза, и они поглощались дендритными клетками. Такие DC демонстрировали значительное снижение экспрессии MHC-II, CD40 и CD86 и способности вызывать пролиферацию CD8⁺ Т-лимфоцитов и продукцию ими IFN γ . Данный эффект опосредовался через тирозинкиназный рецептор Мег дендритных клеток. Аналогичные исследования при инвазии *Toxoplasma gondii* не выявили подобного ингибирующего эффекта нейтрофилов, фагоцитировавших паразита и затем поглощенных дендритными клетками, на антигенпрезентирующую функцию последних по отношению к CD8⁺ Т-клеткам [180, 181].

В то же время было обнаружено *in vitro* и *in vivo*, что DC, которые «приобретали» *M. tuberculosis* путем интернализации инфицированных ею нейтрофилов, так же эффективно индуцировали пролиферацию и активацию специфичных CD4⁺ Т-клеток, как и DC, которые поглощали бактерии прямым путем. Кроме того, такие DC опережали по миграции в лимфатические узлы DC, непосредственно инфицированные микобактериями [30]. Однако при этом было установлено, что *in vivo* *M. tuberculosis* подавляет апоптоз нейтрофилов, что препятствует своевременному «приобретению» бактерий миелоидными DC, а, значит, задерживает активацию и пролиферацию наивных *M. tuberculosis* антиген-85В-специфических CD4⁺ Т-клеток в лимфатических узлах средостения. Эти результаты показывают, что модуляция апоптоза нейтрофилов *M. tuberculosis* является дополнительным механизмом вирулентности, который изменяет кинетику развития адаптивного иммунитета и способствует развитию туберкулеза [29]. Полученные данные свидетельствуют о вероятности дифференцированного эффекта апоптозных нейтрофилов на активность дендритных клеток в зависимости от природы инфицирующего агента, и о способности разных микроорганизмов, таким образом, влиять на развитие адекватного адаптивного иммунного ответа и на дальнейшее течение болезни.

В комплексе, приведенные выше данные свидетельствуют о способности нейтрофилов модулировать дендритные клетки в сторону приобретения ими толерогенных свойств, что в итоге способствует ограничению чрезмерного воспаления и предотвращает развитие аутоиммунных процессов [11].

Тот факт, что нейтрофилы влияют на функции и активность дендритных клеток, а они, в свою очередь, играют важную роль в инициации развития адаптивного иммунного ответа, отражает опосредованное воздействие нейтрофильных гранулоцитов на механизмы приобретенного иммунитета. Однако в последние годы появились данные, свидетельствующие и о прямом регулирующем действии нейтрофилов на основных участников адаптивного иммунитета — Т- и В-лимфоцитов.

Нейтрофилы и Т-лимфоциты

Как известно, развитие первичного адаптивного иммунного ответа начинается с презентации наивным Т-лимфоцитам процессированного антигена, встроенного в молекулы МНС, и дополнительной их активации ко-стимулирующими рецепторами, что осуществляется «профессиональными» антигенпрезентирующими клетками (antigen-presenting cells — APC), к которым традиционно относятся дендритные клетки, моноциты/макрофаги и В-лимфоциты, постоянно экспрессирующие МНС-II. Однако на сегодняшний день получены доказательства, что нейтрофилы также могут проявлять себя в качестве APC [128].

В более ранних исследованиях было показано, что в условиях *in vitro* экспрессия молекул МНС-II на нейтрофилах человека индуцируется гранулоцитарно-макрофагальным колоние-стимулирующим фактором (GM-CSF), IFN γ и IL-3, причем IFN γ также вызывает экспрессию ко-стимулирующих молекул CD80 и CD86, в результате чего нейтрофилы приобретают способность презентировать некоторые микробные (в частности, *S. aureus*) суперантигены CD4⁺ Т-клеткам [67, 81, 175].

Экспрессия МНС-II и ко-стимулирующих молекул CD80 и CD86 наблюдалась на нейтрофилах, выделенных из крови пациентов с гранулематозом Вегенера в активной стадии заболевания [91, 100]. В нейтрофилах, выделенных из периферической крови пациентов с ревматоидным артритом, детектировалось небольшое количество мРНК МНС-II (в отличие от нейтрофилов здоровых доноров, где мРНК МНС-II отсутствовала), но поверхностной или внутриклеточной экспрессии этих молекул не наблюдалось [48]. Нейтрофилы синовиальной жидкости этих же больных имели высокий уровень

мРНК МНС-II, также не экспрессируя МНС-II на мембране, но содержали большие внутриклеточные количества этого белка. Однако после 20 ч культивирования *in vitro* синовиальные нейтрофилы проявляли значительную поверхностную экспрессию молекул МНС-II, сравнимую с таковой у профессиональных APC, при низком уровне CD80 и CD86 и стимулировали пролиферацию CD4⁺ Т-лимфоцитов [48].

Несколько позже было показано, что нейтрофилы периферической крови человека содержат цитоплазматические запасы молекул МНС-II (DR), CD80 и CD86, которые хранятся преимущественно в секреторных везикулах, хотя CD86 также обнаруживается в первичных (азурофильных) и во вторичных (специфических) гранулах. При этом быстрая (в течение 2–5 мин) Ca²⁺-зависимая транслокация данных молекул на поверхность клеток происходит вследствие перекрестной сшивки Mac-1 (CD11b/CD18), а также при активации нейтрофилов LPS, N-формил-метионил-лейцил-фенилаланином (fMLP), форбол-миристан-ацетатом (FMA). После выхода на мембрану CD80 и CD86 локализуются в больших кластерах, напоминающих супрамолекулярные антигенные кластеры, ранее обнаруженные на классических антиген-представляющих клетках. Эти данные дают дополнительную поддержку гипотезе о том, что нейтрофилы могут играть определенную роль в презентации антигена и/или активации Т-клеток [188, 189].

В недавних исследованиях было установлено, что нейтрофилы, выделенные из крови здоровых доноров, не экспрессируют молекулы МНС-II (HLA-DR) и ко-стимулирующие молекулы CD86, CD80, CD40, CD83, необходимые для презентации антигена CD4⁺ Т-лимфоцитам [229]. При этом было обнаружено, что нейтрофилы могут проявлять презентирующую способность пептидных антигенов аутологичным антигенспецифическим CD4⁺ Т-клеткам памяти и индуцировать их пролиферацию *in vitro* и продукцию ими IFN γ , IL-2 и/или TNF α , хотя эта активность у нейтрофилов проявлялась слабее, чем у дендритных клеток и моноцитов. Авторы установили, что для усиления экспрессии значимых для презентации поверхностных молекул и рецепторов нейтрофилам необходимы дополнительные сигналы, которые они получают при совместной инкубации с антигеном и аутологичными антигенспецифическими CD4⁺ Т-лимфоцитами. При этом ключевым является IFN γ , хотя не исключается роль и других цитокинов. Однако даже в таких условиях уровня экспрессии МНС-II и ко-стимулирующих молекул хватает только для презентации антигена Т-клеткам памяти и недостаточно для активации наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов,

чего не скажешь о классических APC [229]. Полученные данные демонстрируют взаимобразные отношения Т-лимфоцитов и нейтрофилов в плане презентации антигена. Таким образом, вероятно, для того чтобы нейтрофилы смогли осуществить презентацию антигена Т-лимфоцитам *in vivo*, необходима индукция достаточного уровня поверхностной экспрессии МНС-II и костимулирующих молекул цитокинами (особенно $IFN\gamma$) Т-клеток, активированных, возможно, близлежащими «профессиональными» APC, например, дендритными клетками, а также, вероятно, необходим и прямой контакт нейтрофильных гранулоцитов и Т-лимфоцитов [128].

Кроме того, было обнаружено, что нейтрофилы человека, выделенные из периферической крови, содержат небольшой запас биологически активного $IFN\gamma$, который могут выделять при стимуляции *in vitro* IL-12 и/или его комбинацией с IL-2, IL-15, IL-18, LPS, а также могут синтезировать $IFN\gamma$ *de novo* при активации данными цитокинами, особенно IL-12 [65]. Данный факт демонстрирует наличие аутокринного механизма регуляции функций нейтрофилов, в том числе, вероятно, и их антигенпрезентирующей способности [65]. Механизмы, с помощью которых нейтрофил осуществляет процессинг антигена, пока слабо изучены. Также требует дальнейшего исследования природа антигенов, которые могут процессироваться и презентироваться нейтрофилами [128].

Полученные результаты, возможно, позволяют считать нейтрофилы условными антигенпрезентирующими клетками в том смысле, что данная способность у них зависит от условий, в которых они находятся и функционируют. При этом способность нейтрофилов менять свои функциональные и фенотипические характеристики отражает высокую пластичность этих клеток.

Недавние исследования продемонстрировали возможность локализации костимулирующих молекул CD80 и CD86 в нейтрофильных внеклеточных ловушках, полученных при стимуляции нейтрофилов человека *in vitro* LPS или овальбумином (OVA), что является еще одним доказательством потенциальной способности нейтрофилов выполнять антигенпрезентирующую функцию [182].

Для реализации своей потенциальной антигенпредставляющей способности *in vivo* в полной мере нейтрофилам, захватившим антиген, необходимо встретиться с Т-лимфоцитами и вступить с ними в контакт, для чего им нужно мигрировать в Т-зоны вторичных лимфоидных органов. Возможно ли это? До недавнего времени считалось, что нейтрофилы способны мигрировать только из кровотока в воспали-

ные ткани. Однако в последние годы появились данные, свидетельствующие о возможности рекрутирования нейтрофилов из сайтов воспаления в дренирующие лимфатические узлы в условиях инфекции на моделях животных [14, 23, 40, 88, 89, 138, 243].

Для миграции нейтрофилов через лимфатические сосуды требуются хемокиновые рецепторы. Возможными кандидатами являются CCR7 и CXCR4, лигандом для которого является CXCL12, экспрессируемый лимфатическими эндотелиальными клетками [23, 89]. Однако, вероятно, экспрессия рецепторов на нейтрофилах и их значимость в процессе рекрутирования зависит от характера возбудителя и от времени [88]. Еще одной важной молекулой для миграции в лимфоузлы является $\beta 2$ интегрин нейтрофилов CD11b [89].

В недавних исследованиях было показано, что при вакцинации обезьян макак-резус поверхностным гликопротеином (Env) ВИЧ-1 с алюминиевым адьювантом, наряду с моноцитами и дендритными клетками, нейтрофилы осуществляли поглощение антигена в месте введения и затем доставляли его в дренирующие лимфоузлы, осуществляя презентацию Env CD4⁺ Т-клеткам памяти [125].

Активация антигенспецифических CD4⁺ Т-лимфоцитов запускает процесс их пролиферации и дифференцировки в адаптивные субпопуляции. В последние годы большое внимание было уделено взаимоотношениям нейтрофилов с одной из субпопуляцией Т-лимфоцитов — Th17. Т-хелперы 17 (Th17) продуцируют IL-17A (IL-17), IL-17F, IL-21, IL-22, IL-26, хемокин CCL20 [159, 220]. IL-17A способен индуцировать экспрессию ряда провоспалительных медиаторов, таких как IL-1, IL-6, TNF α , CXCL8 (IL-8), G-CSF и GM-CSF, эпителиальными, эндотелиальными и стромальными клетками, что способствует рекрутированию и активации нейтрофилов. В свою очередь активированные нейтрофилы выделяют хемокины CCL20 и CCL2, которые способствуют привлечению Th17, что отражает положительную обратную связь (своего рода «замкнутый круг») между этими типами клеток и их участие в развитии воспалительных заболеваний [162]. Следует отметить, что нейтрофилы также секретируют CCL2, CXCL9, CXCL10 — хемокины, привлекающие Th1 [162].

Как было сказано выше в разделе «Нейтрофилы и дендритные клетки», компоненты NETs активируют плазмацитоподобные DC (pDC) TLR9-зависимым способом [75, 119, 194, 205]. Кроме того, было установлено, что Т-лимфоциты периферической крови человека тоже экспрессируют TLR9 [177]. Однако было выявлено, что в условиях *in vitro*

NETs действительно оказывают прямое воздействие на CD4⁺ Т-лимфоциты человека, но TLR9-независимым путем с вовлечением Т-клеточного рецептора (TCR) [221]. При этом было обнаружено, что *in vitro* NETs стимулируют усиление экспрессии CD25 (IL-2R) и CD69 на CD4⁺ Т-лимфоцитах, но не вызывают ни пролиферации, ни секреции цитокинов CD4⁺ Т-клетками, что свидетельствует о способности NETs индуцировать преактивацию (праймирование) CD4⁺ Т-лимфоцитов [221]. Авторы предположили, что вероятно активация CD4⁺ Т-лимфоцитов нейтрофильными внеклеточными ловушками происходит в два этапа: NETs путем прямого контакта с участием TCR (но не TLR9) вызывают праймирование Т-клеток, усиливая экспрессию активационных рецепторов CD25 и CD69; праймированные CD4⁺ Т-лимфоциты затем демонстрируют усиленный антигенспецифический ответ и могут быть активированы субоптимальными стимулами, недостаточными, чтобы вызвать реакцию покоящихся CD4⁺ Т-клеток [221]. При этом также были получены очень интересные результаты, показавшие, что в условиях *in vitro* миелоидные DC, инкубированные с NETs в течение 24 ч, погибали, а плазматоидные DC сохраняли жизнеспособность и демонстрировали повышение экспрессии активационных маркеров CD40, CD80, CD83, CD86. Дальнейшая инкубация NETs-активированных pDC с непраймированными CD4⁺ Т-лимфоцитами не вызывала ни пролиферации последних, ни продукции ими IFN γ . Однако культивирование NETs-активированных pDC с Т-клетками, предварительно праймированными NETs, приводило к пролиферации Т-лимфоцитов и образованию ими IFN γ . Кроме того, совместное культивирование NETs, pDC и CD4⁺ Т-лимфоцитов или NETs, pDC и CD8⁺ Т-лимфоцитов вызывало пролиферацию и продукцию IFN γ Т-клетками [221].

Активационные стимулы нейтрофилов по отношению к Т-лимфоцитам — это «одна сторона медали». Нейтрофильные гранулоциты также могут оказывать супрессорное действие в отношении функциональной активности и пролиферации Т-клеток и даже вызывать их гибель, что реализуется через несколько механизмов.

Первый механизм связан с истощением в микросреде незаменимой аминокислоты L-аргинина. В желатиназных гранулах нейтрофилов человека хранится эксклюзивный запас фермента аргиназы 1 (Arg1) в неактивной форме [133, 152]. Превращение данного фермента в активную форму происходит при одновременном экзоцитозе желатиназных и азуро-

фильных гранул (то есть в условиях активации нейтрофилов) под действием сериновых протеаз последних [186]. Внеклеточная аргиназа 1 метаболизирует L-аргинин (в L-орнитин и мочевины), вызывая его дефицит. Недостаток L-аргинина приводит к супрессии пролиферации активированных Т-клеток, не нарушая при этом их жизнеспособность [93, 153, 183, 186]. Также дефицит L-аргинина потенцирует «биохимическое перепрограммирование» активированных Т-лимфоцитов [69, 84], подавляя синтез и секрецию ими IFN γ , IL-10, TNF α , практически не влияя при этом на продукцию IL-2, IL-6, IL-8 [69, 153]. В условиях истощения L-аргинина в среде происходит снижение экспрессии CD3-дзета-цепи Т-клеточного рецептора (TCR ζ , CD247) и, как следствие, нарушение передачи активационных сигналов внутрь клетки [107, 153, 167, 184]. Также дефицит L-аргинина ингибирует дефосфорилирование белка кофилина в активированных Т-клетках, что приводит к изменению полимеризации F-актина и, таким образом, к нарушению организации иммунологического синапса между Т-лимфоцитом и антигенпрезентирующей клеткой [69].

Также было установлено, что сериновые протеазы, выделяющиеся при дегрануляции активированных нейтрофилов человека (эластаза, протеиназа 3) в условиях посттравматического воспаления, могут вызывать расщепление и солюбилизацию эктодоменов рецепторов к IL-2 (CD25) в условиях *in vitro*, нарушая, таким образом, активацию и запуск пролиферации Т-лимфоцитов [19].

Интересным является тот факт, что у женщин с нормально протекающей беременностью нейтрофилы периферической крови демонстрировали более высокий уровень активности и экспрессии аргиназы 1, чем нейтрофилы небеременных женщин. Кроме того, в биоптатах плаценты были обнаружены аргиназа 1-экспрессирующие нейтрофилы. При этом уровень экспрессии фермента нейтрофилами плаценты и периферической крови беременных женщин практически не отличался. Авторами был сделан вывод, что аргиназа 1 нейтрофилов представляет собой новый иммунорегуляторный механизм, который ограничивает неадекватную или чрезмерную иммунную активацию и формирует гипореактивность Т-лимфоцитов матери, способствуя сохранению беременности [116].

Другим важным механизмом супрессорного влияния нейтрофилов на Т-клетки являются активные формы кислорода (reactive oxygen species — ROS), в частности H₂O₂. Они могут ингибировать пролиферацию Т-лимфоцитов путем подавления активации транскрипцион-

ного фактора NF-κB, а также уменьшать экспрессию TCRζ (CD3-дзета-цепи) и вызывать окисление кофилина [111, 139, 193]. Однако некоторыми авторами было отмечено, что для реализации супрессорного и антипролиферативного эффекта необходима высокая концентрация H₂O₂, что, возможно, достигается большим скоплением нейтрофилов [111, 167, 193]. Кроме того H₂O₂ нестабильна и может разрушаться эндогенными антиоксидантами, поэтому для ее влияния на Т-лимфоциты необходим тесный контакт между нейтрофилом и Т-клеткой [93, 163]. В этой связи необходимо отметить, что в периферической крови людей с острым системным воспалением, индуцированным введением эндотоксина *E. coli* здоровым добровольцам или тяжелыми травмами, была идентифицирована субпопуляция зрелых нейтрофилов с фенотипом CD11c^{bright}CD62L^{dim}CD11b^{bright}CD16^{bright}, способных подавлять пролиферацию Т-клеток *in vitro*. Эти нейтрофилы проявляли свой супрессорный эффект через локальное выделение перекиси водорода в иммунологический синапс с Т-клеткой, образуемый при участии интегрина Mac-1 (CD11b/CD18) [166].

Кроме антипролиферативного эффекта H₂O₂ также способна индуцировать апоптоз Т-лимфоцитов, вызывая, в конечном итоге, их гибель [93].

Интересно, что CD4⁺CD25^{bright}FOXP3⁺CD127^{dim/low} регуляторные Т-клетки (Treg) менее чувствительны к ROS-индуцированной клеточной гибели, чем другие субпопуляции CD4⁺ Т-лимфоцитов [151]. При этом они способны продуцировать хемокин CXCL8 (IL-8) и вызывать, тем самым, рекрутирование нейтрофилов [92]. Таким образом, нейтрофилы и Treg совместно способствуют созданию иммуносупрессорной среды, что, с одной стороны, предотвращает развитие аутоиммунных процессов, с другой стороны, может способствовать прогрессии злокачественных опухолей [28, 92].

В то же время было установлено, что нейтрофильный катионный пептид кателицидин LL-37, выделяющийся при дегрануляции и входящий в состав NETs, способен вызывать гибель стимулированных и нестимулированных CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg, а также стимулированных CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов, запуская в этих клетках гранзим- и каспаза-зависимые пути апоптоза, не влияя при этом на CD4⁺CD25⁻ Т-клетки [134, 135].

Еще один механизм, опосредующий супрессорное влияние нейтрофилов на функциональную активность и пролиферацию Т-лимфоцитов, реализуется посредством прямого контакта между этими клетками через PD-L1-PD1 путь [163]. Рецептор PD1 (programmed cell death)

экспрессируется в основном активированными Т-клетками. Когда этот рецептор связывается с одним из его лигандов, происходит ингибирование пролиферации Т-клеток, продукции ими цитокинов и индукция апоптоза [200]. Лиганд 1 PD1 (PD-L1, B7-H1, CD274) сначала был идентифицирован как коингибирующая молекула на дендритных клетках и моноцитах (то есть на профессиональных антигенпрезентирующих клетках), а затем и на нейтрофилах человека, стимулированных липополисахаридом, IFNγ и GM-CSF [20, 137]. Как было отмечено ранее, IFNγ также индуцирует экспрессию на нейтрофилах MHC-II (HLA-DR) и костимулирующих молекул (CD86), необходимых для презентации антигена. Таким образом, вероятно, действие одних и тех же цитокинов одновременно вызывает появление на мембране нейтрофилов и костимулирующих, и коингибирующих по отношению к Т-лимфоцитам молекул [20].

В клиническом исследовании на добровольцах с острым системным эндотоксин-индуцированным воспалением через 4 ч после внутривенного введения липополисахарида в периферической крови были выявлены 3 субпопуляции нейтрофилов: CD16^{bright}/CD62L^{bright} (нормальные циркулирующие) (62%), CD16^{dim}/CD62L^{bright} (незрелые) (19%) и CD16^{bright}/CD62L^{dim} (19%) [53]. Как было установлено в более ранних исследованиях, нейтрофилы с фенотипом CD16^{bright}/CD62L^{dim} являются супрессорными и способны подавлять пролиферацию Т-клеток *in vitro* [166]. Транскриптомный анализ выявил у данной супрессорной субпопуляции нейтрофилов IFN-индуцированный транскриптомный профиль, то есть усиление экспрессии IFN-индуцированных генов. В том числе у клеток CD16^{bright}/CD62L^{dim} была значительно увеличена экспрессия гена CD274, кодирующего PD-L1, по сравнению с нейтрофилами CD16^{bright}/CD62L^{bright} и CD16^{dim}/CD62L^{bright} [53]. При дальнейшем исследовании *in vitro* было установлено, что особенно IFNγ и в меньшей степени IFNα или IFNβ, но не G-CSF, GM-CSF, TNFα или LPS, увеличивали экспрессию PD-L1 на нейтрофилах, а IFNγ-стимулированные нейтрофилы демонстрировали наибольшую супрессорную активность в отношении фитогемагглютинин-индуцированной пролиферации Т-лимфоцитов, реализуемую через прямой контакт при участии PD-L1 нейтрофилов [53].

Недавние исследования показали, что в крови пациентов с тяжелым сепсисом, также как и у септических мышей, были обнаружены PD-L1⁺ нейтрофилы, вызывающие *in vitro* апоптоз лимфоцитов контакт-зависимым путем; их количество было значительно увеличено и положительно коррелировало с тяжестью сепсиса,

на основании чего уровень PD-L1+ нейтрофилов было предложено использовать как потенциальный биомаркер для диагностики сепсис-индуцированной иммуносупрессии [232].

Нейтрофилы и В-лимфоциты

Влияние нейтрофилов на В-лимфоциты также имеет две стороны. Было установлено, что в определенных сайтах около маргинальной зоны (marginal zone — MZ) селезенки человека присутствуют нейтрофилы, которые в отличие от циркулирующих в крови нейтрофилов, способны активировать MZ В-лимфоциты, индуцировать соматическую гипермутацию, переключение классов иммуноглобулинов (с IgM на IgG и IgA) и продукцию антител, в связи с чем такие нейтрофилы были названы «В-хелперные» ($N_{ВН}$) [173]. MZ В-лимфоциты экспрессируют полиреактивные В-клеточные рецепторы (BCR), которые могут связываться с различными микробными молекулярными паттернами, и TLR. Роль MZ В-клеток до конца не изучена, но известно, что они осуществляют преимущественно тимуснезависимый гуморальный иммунный ответ на циркулирующие в крови антигены, в первую очередь на бактериальные полисахариды, в том числе капсульные. Также имеются свидетельства, указывающие на способность человеческих MZ В-клеток участвовать в ответе и на тимусзависимые пептидные антигены [35].

Было определено, что активирующее действие $N_{ВН}$ на MZ В-клетки реализуется преимущественно через продукцию BAFF (фактор, активирующий В-клетки; B-cell activating factor), APRIL (лиганд, индуцирующий пролиферацию; a proliferation-inducing ligand) и IL-21 [173]. Кроме того, $N_{ВН}$, экспрессирующие эластазу, CD15 и молекулу адгезии CEACAM-1, способны формировать ДНК-содержащие NET-подобные структуры, которые образуют тесный контакт с IgD-экспрессирующими В-клетками [173].

На основании фенотипических и функциональных отличий авторами были идентифицированы две субпопуляции $N_{ВН}$: $N_{ВН1}$ и $N_{ВН2}$ [173]. В отличие от обычных нейтрофилов (conventional neutrophils — N_C), экспрессирующих CD15 и CD16 в большом количестве, $N_{ВН1}$ демонстрировали промежуточный, а $N_{ВН2}$ — низкий уровень экспрессии данных маркеров; при этом обе субпопуляции $N_{ВН}$ не отличались от циркулирующих нейтрофилов по морфологии и ультраструктуре. По сравнению с N_C клетки $N_{ВН1}$ и $N_{ВН2}$ экспрессировали больше CD11b и CD24, молекул, которые ингибируют передачу сигналов с TLR, и CD27, CD40L, CD86 (B7-2), CD95 (Fas), HLA-I и HLA-II, маркеров иммунной активации. Кроме того,

клетки $N_{ВН1}$ и $N_{ВН2}$ экспрессировали меньше адгезионных молекул CD54 (ICAM-1), CD62L (L-селектин), CD62P (P-селектин) и CD102 (ICAM-2). При этом $N_{ВН1}$ были более активированы, чем $N_{ВН2}$, и экспрессировали больше CD27, CD40L, CD86, CD95 и HLA-II, но меньше CD24. В сравнении с N_C нейтрофилы $N_{ВН1}$ и $N_{ВН2}$ характеризовались большим количеством мРНК В-стимулирующих молекул BAFF, APRIL, IL-21, В-клеточных хемоаттрактантов CXCL12 и CXCL13, рецепторов TLR7 и TLR8, цитокинов IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF, иммунорегуляторных молекул IL-10, аргиназы 1, ретинальдегиддегидрогеназы 1 (RALDH1), индуцибельной NO-синтазы (iNOS), индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), програнулина, секреторного ингибитора протеиназы лейкоцитов (SLPI), супрессора цитокиновых сигналов 1 (SOCS1). При этом $N_{ВН1}$ экспрессировали более высокие количества многих вышеуказанных мРНК, чем клетки $N_{ВН2}$, и имели больше мРНК антиапоптотических белков bcl-2, bcl-xL и mcl-1, но меньше мРНК проапоптотических белков bak1. Экспрессия вышеперечисленных иммунорегуляторных молекул коррелировала со способностью $N_{ВН}$ индуцировать супрессию пролиферации CD4⁺ Т-клеток, активированных через CD3 и IL-2. Таким образом, популяция $N_{ВН}$ демонстрировала двойственность функций: В-хелперы — Т-супрессоры [173].

Также авторы установили, что в условиях *in vivo* В-хелперные нейтрофилы могут генерироваться из циркулирующих нейтрофилов вследствие действия регуляторного цитокина IL-10, продуцируемого синусоидальными эндотелиальными клетками и макрофагами селезенки [173]. Действительно, при инкубации N_C в присутствии IL-10 *in vitro* клетки приобретали $N_{ВН}$ -подобный фенотип (индуцибельные $N_{ВН}$ клетки — $iN_{ВН}$), демонстрируя снижение экспрессии CD15 и CD16, увеличение уровня мРНК BAFF и APRIL и способность активировать В-лимфоциты. Также в индукции $iN_{ВН}$ участвовали GM-CSF и микробные продукты — липополисахарид и зимозан. Было установлено, что $N_{ВН}$ заселяют селезенку постнатально, когда слизистая оболочка кишечника колонизируется комменсальной микробиотой. При этом микробные продукты (LPS, пептидогликан и др.) транслоцируются в кровь, праймируя через TLR различные клетки селезенки и способствуя рекрутированию нейтрофилов и перепрограммированию их в $N_{ВН}$. $N_{ВН}$, активируя MZ В-лимфоциты, усиливают антигенный иммунный ответ на консервативные микробные тимус-независимые антигены [173]. NET-подобные структуры $N_{ВН}$, захватывая комменсальные антигены, могут усиливать их контакт с TLR и В-клеточным рецептором.

Кроме того, они могут дополнительно стимулировать MZ В-клетки через TLR за счет собственной ДНК [35].

В то же время активация В-лимфоцитов нейтрофилами может иметь и патологические последствия. Так, в недавней публикации был описан механизм прямого влияния нейтрофилов на генерацию аутоантител у пациентов с системной красной волчанкой [80]. Авторы показали, что комплекс ДНК с кателицидином LL-37, содержащийся в NETs, обладает уникальной способностью проникать в эндосомальные компартменты В-клеток и инициировать стимуляцию TLR9. В результате через TLR9 запускается поликлональная активация В-лимфоцитов, а также специфическая экспансия аутореактивных В-клеток памяти, продуцирующих анти-LL-37-антитела [80].

Наряду со стимулирующим влиянием нейтрофилов на В-лимфоциты на модели мышей был выявлен и противоположный супрессорный эффект. При иммунизации и экспериментальной инфекции, вызванной *S. aureus*, с помощью прижизненной микроскопии было обнаружено рекрутирование *S. aureus*⁺ нейтрофилов в дренирующие лимфоузлы, где наблюдалось их взаимодействие с В-лимфоцитами. При этом мигрировавшие нейтрофилы образовывали межклеточные синапсоподобные контакты с В-клетками и секретировали TGF- β 1, оказывая супрессорный эффект и ингибируя продукцию антител [108].

Нейтрофилы и рак

Рак — хроническое заболевание, развитие которого зависит от взаимодействия опухолевых клеток с их микроокружением. При этом рак представляет собой воспаление, «незаживающую рану» [58], и воспалительный ответ является важным фактором развития опухолей [34, 170]. По сравнению с другими иммунными клетками, нейтрофилам уделяли мало внимания при этой патологии. Однако экспериментальные данные и клинические наблюдения, проведенные за последние годы, демонстрируют двойственную роль нейтрофилов в инициации, росте, прогрессии и метастатическом распространении опухолей [155, 170, 201]. При этом ряд ученых отмечает, что многие данные о значении нейтрофилов при раке были получены при исследовании опухолей у мышей, и поэтому не могут быть абсолютно релевантными в отношении организма человека, а значит, требуют дальнейшего изучения [63]. Кроме того, необходимо учитывать, что роль нейтрофилов также может быть неодинаковой при разных типах рака [170]. Влияние нейтрофилов на развитие злокачественных опухолей

может реализовываться как через прямое воздействие на опухолевые клетки, так и опосредованно через регуляцию механизмов противоопухолевого иммунного ответа.

За счет продукции различных хемокинов и факторов роста клетками опухолевого микроокружения нейтрофилы одними из первых мигрируют к опухоли на ранних стадиях ее формирования, усиленно инфильтрируют очаги опухолевого роста и становятся активными компонентами стромы [63, 71, 201]. Такие нейтрофилы, инфильтрирующие опухоль, получили название «тумор-ассоциированные нейтрофилы» (tumor-associated neutrophils — TANs). На мышинной модели опухолей было установлено, что TANs могут обладать как проопухолевой активностью, так и противоопухолевым действием, в связи с чем они были классифицированы на два фенотипа: TANs N1 (с противоопухолевой и провоспалительной активностью) и TANs N2 (с проопухолевым действием). При этом было установлено, что поляризация TANs из одного фенотипа в другой во многом определяется сигналами, генерируемыми самой опухолью и ее микроокружением. Например, TGF- β , продуцируемый опухолью, способствует трансформации TAN-N1 в TAN-N2, а IFN β , наоборот, индуцирует фенотип N1 [17, 71, 72, 101, 165]. У мышей клетки N1 имеют зрелую морфологию и гиперсегментированное ядро, в то время как N2 характеризуются палочковидным или кольцеобразным ядром подобно незрелым нейтрофилам [72]. В связи с этим остается до конца нерешенным вопрос, являются ли TANs N1 и N2 двумя отдельными самостоятельными субпопуляциями, либо представляют собой различные стадии созревания или активации тумор-ассоциированных нейтрофилов [63].

Выделяемые активированными нейтрофилами миелопероксидаза (MPO), активные формы кислорода (ROS) и азота (reactive nitrogen species — RNS) могут вызывать прямое повреждение ДНК (генотоксичность), способствуя инициации опухолевого роста, а также трансформировать различные химические вещества в метаболиты с канцерогенными и мутагенными свойствами [16, 112, 155].

Нейтрофильная матриксная металлопротеиназа 9 (MMP-9) способствует раннему ангиогенезу опухоли, высвобождая фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor — VEGF) из экстрацеллюлярного матрикса, и может предотвращать апоптоз опухолевых клеток [24, 55, 126, 165]. Кроме того, тумор-ассоциированные нейтрофилы содержат внутриклеточный пул VEGF, мощного ангиогенного фактора, который могут выделять при стимуляции, а также образовывать этот белок *de novo* [77, 126, 235]. Также опухоль-ассоции-

рованные нейтрофилы могут синтезировать и затем секретировать при прямом контакте с опухолевыми клетками белок онкостатин М, принадлежащий к семейству IL-6. Связываясь с рецепторами на опухолевых клетках, онкостатин М усиливает их пролиферацию, повышает неоваскуляризацию опухоли и ее инвазивность [3, 174, 206]. Эластаза нейтрофилов (NE) также может быть вовлечена в начальные этапы развития опухоли, непосредственно стимулируя опухолевую пролиферацию [96, 126, 155, 156]. Кроме того высокие уровни NE способствуют инвазии и метастазированию опухоли на более поздних этапах, а повышение ее количества в опухолевой ткани коррелирует с плохим прогнозом заболевания, например, при раке молочной железы и легких [190]. Металлопротеиназы, высвобождаемые при активации нейтрофилов, также могут усиливать миграцию опухолевых клеток и инвазивность опухоли, влияя на внеклеточный матрикс [126].

Установлено, что некоторые факторы, продуцируемые нейтрофилами, в частности TGF- β и эластаза, могут способствовать эпителиально-мезенхимальному переходу (epithelial-mesenchymal transition — EMT) опухолевых клеток, например, при аденокарциноме легких и поджелудочной железы, в результате которого эпителиоциты изменяют свой фенотип, теряют плотные межклеточные соединения, приобретают способность изменять базальную мембрану и мигрировать. В конечном итоге EMT приводит к повышению инвазивности и метастазированию опухоли, помогая экстравазации опухолевых клеток во вторичных очагах [85, 97, 106, 126].

Метастазированию опухолей могут способствовать не только тумор-ассоциированные нейтрофилы, но и нейтрофилы, циркулирующие в крови. Например, клетки меланомы, попадая в кровоток, секретируют IL-8 и усиливают экспрессию $\beta 2$ интегрина (Mac-1) на нейтрофилах. Нейтрофильный $\beta 2$ интегрин взаимодействует с ICAM-1 клеток меланомы, что приводит к их прикреплению к эндотелиоцитам с последующей экстравазацией и, таким образом, к метастазированию, например, в легкие [99, 165].

Метастазированию опухоли, вероятно, могут способствовать и нейтрофильные внеклеточные ловушки, захватывая циркулирующие опухолевые клетки, гематогенно транспортируя их в отдаленные органы и способствуя их экстравазации [46, 47, 61, 126].

Также в моделях на мышах было показано, что опухолевые клетки в условиях гипоксии (особенно в центре опухолевого узла) способны индуцировать образование NETs [222]. NETs, в свою очередь, промотируют

TLR9-опосредованную активацию опухолевых клеток, что усиливает пролиферацию, адгезию, миграцию и инвазивность последних. Ключевым фактором в этом процессе является NET-ассоциированный HMGB1 (high mobility box protein 1), образующий комплекс с ДНК, хотя и такие компоненты NETs, как MMP-9, кателицидины, катепсин G, эластаза, вносят свой вклад в прогрессию опухоли. NETs также способны активировать клетки микроокружения опухоли и вызывать продукцию ими провоспалительных цитокинов и хемокинов, таких как IL-6, TNF α , CXCL10, которые также способствуют опухолевой прогрессии. При этом протуморогенные эффекты NETs ингибируются ДНКазой и факторами, подавляющими активность PAD4 [222].

Кроме того, была обнаружена уникальная способность опухолей в некоторых случаях модифицировать микроокружение в отдаленных от первичного очага сайтах с целью последующей ориентации опухолевых клеток и метастазированию в эти участки. Таким образом, опухоль «подготавливает почву» или формирует предмета статическую нишу [172]. При этом основную роль в подготовке этой ниши, как было установлено, играют клетки из костного мозга (bone marrow-derived cells — BMDCs), которые рекрутируются в предмета статические сайты за счет различных факторов, продуцируемых в первичном очаге опухоли [60, 105, 109, 176, 236]. На модели рака молочной железы у мышей было установлено, что одним из ключевых факторов, регулирующих эту подготовку, является G-CSF, продуцируемый опухолью, а основным клеточным компонентом микроокружения предмета статической ниши в отдаленном органе (в данном случае — в легких) являются LybG⁺LybC⁺ нейтрофилы [115]. Данные клетки под действием G-CSF мобилизуются из костного мозга и демонстрируют высокий уровень экспрессии белка V α 8, который в свою очередь способствует хоумингу LybG⁺LybC⁺ нейтрофилов в легкие. В легких LybG⁺LybC⁺ нейтрофилы продуцируют V α 8, MMP-9, S100A8, S100A9, которые способствуют последующей миграции, инвазии и выживанию метастазирующих опухолевых клеток в этом органе [115, 126].

В недавней публикации было отмечено, что CD11b⁺/LybG⁺ нейтрофилы мышей с раком молочной железы усиливают образование метастазов через два разных механизма. Во-первых, они ингибируют функцию NK-клеток, что приводит к значительному увеличению времени выживания опухолевых клеток в циркуляторном русле. Во-вторых, посредством секреции IL-1 β и матриксных металлопротеиназ нейтрофилы облегчают экстравазацию опухолевых клеток [212].

Опосредованное протуморогенное действие TANs связано с супрессией противоопухолевого иммунного ответа. TANs N2 обладают повышенной активностью аргиназы 1, которая ответственна за истощение L-аргинина и, как следствие, за ингибирование пролиферации цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов и, значит, противоопухолевого иммунного ответа [70, 71]. Как было сказано в разделе «Нейтрофилы и Т-лимфоциты», ROS активированных нейтрофилов могут ингибировать пролиферацию Т-лимфоцитов путем подавления активации транскрипционного фактора NF-κB, уменьшать экспрессию TCRζ (CD3-дзета-цепи), вызывать окисление кофилина [111, 139, 193] и индуцировать апоптоз Т-лимфоцитов, приводя, в конечном итоге, к их гибели [93]. При этом TANs, особенно фенотипа N2, могут выделять хемокины CCL17 и CCL5, которые способствуют привлечению в опухоль регуляторных Т-клеток (Treg), обладающих иммуносупрессорным действием [15, 126, 150], и, как было отмечено, менее чувствительных к ROS [151]. Хемокины CCL2 и CCL20, которые выделяют нейтрофилы, вызывают рекрутирование Th17, которые, в свою очередь, секретируют IL-17 и усиливают приток нейтрофилов в сайт опухоли [126, 162].

Несмотря на множественные проопухолевые влияния нейтрофилов, были также зарегистрированы и противоопухолевые эффекты этих клеток, характерные для N1 TANs, которые могут реализоваться разными механизмами: прямыми и опосредованными через воздействие на другие клетки иммунной системы.

Прямое цитолитическое действие на клетки различных типов опухолей могут оказывать, например, ROS (H₂O₂, HOCl, O₂⁻) активированных нейтрофилов [50, 127, 246, 247]. В недавней публикации авторами было отмечено, что H₂O₂-обусловленная цитотоксичность нейтрофилов опосредуется TRPM2 [79]. TRPM2 является катионным каналом, чувствительным к окислительно-восстановительному стрессу, экспрессируемым на многих типах клеток, включая опухолевые. Через этот канал происходит вход Ca²⁺, индуцируемый перекисью водорода в ходе клеточной смерти [147].

Тумор-ассоциированные нейтрофилы способны непосредственно ингибировать пролиферацию и выживаемость опухолевых клеток через продукцию и последующее связывание с рецепторами на опухолевых клетках TRAIL, апоптоз-индуцирующего лиганда суперсемейства TNF (TNF-related apoptosis-inducing ligand) [113, 126]. Кроме того, нейтрофилы способны вызывать гибель опухолевых клеток через механизм антителозависимой клеточной цитотоксичности [42, 110].

Некоторые авторы отмечают возможный противоопухолевый эффект нейтрофильных внеклеточных ловушек, образуемых TANs, за счет прямого киллинга клеток опухоли NET-ассоциированными компонентами, а также вследствие активации дендритных клеток и праймирования Т-лимфоцитов [27].

Как было отмечено выше, опухоли в некоторых случаях способствуют формированию предметастатической ниши в отделенных участках [172], и некоторыми исследователями было установлено, что нейтрофилы могут быть ведущим клеточным компонентом этой ниши, способствуя метастазированию опухоли [115, 126]. Однако в другой работе было показано, что истощение циркулирующих нейтрофилов у мышей с раком молочной железы приводит к увеличению количества очагов метастатического отсева в легких [82]. CD11b⁺Ly-6G⁺ нейтрофилы, направляемые опухолью (tumor-entrained neutrophils — TENs), аккумулируются в легких первыми и, благодаря секретируемому опухолью CCL2, ингибируют метастатические отсева путем прямого цитотоксического действия H₂O₂, независимо от Т-клеток. При этом тот же CCL2 усиливает рост опухоли в первичном очаге, из чего авторами был сделан вывод, что факторы, продуцируемые опухолью, способствуют ее прогрессии в первичном очаге, одновременно подавляя метастазирование «руками нейтрофилов» [82]. При изучении механизмов метастазирования почечной карциномы человека в легкие на химерных мышях было показано, что предварительное рекрутирование и инфильтрация нейтрофилами легких оказывает антиметастатическое действие [131].

Нейтрофилы могут способствовать усилению противоопухолевого иммунного ответа. Так, TANs N1 способствуют рекрутированию и активации цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов, продуцируя хемокины CCL3, CXCL9 и CXCL10 и провоспалительные цитокины IL-12, TNFα, GM-CSF. Также они могут активировать дендритные клетки через прямой клеточный контакт и через секрецию TNFα [71, 72].

Таким образом, нейтрофилы могут оказывать противоположное влияние на течение опухолевого процесса. Вектор активности TANs, про- или противоопухолевой, вероятно, диктуется комплексом факторов: генетическими особенностями, гистологическим типом опухоли, ее локализацией, стадией процесса, свойствами микроокружения и др.

В недавних работах отмечена двойная роль в развитии рака не только нейтрофилов, ассоциированных с опухолью, но и нейтрофилов, циркулирующих в крови [201]. Было установлено, что при ряде солидных опухолей у че-

ловека в периферической крови повышается количество нейтрофилов и отношение числа нейтрофилов к числу лимфоцитов (neutrophil-to-lymphocyte ratio — NLR). Так, метаанализ данных, полученных при обследовании 40 559 пациентов с различными типами солидных опухолей, выявил значительную корреляцию между повышенным NLR и плохим прогнозом заболевания [219]. В недавних исследованиях аналогичные результаты были получены при определении NLR у пациентов, получавших неoadъювантную химиотерапию. Было показано, что более низкий уровень NLR ассоциируется с лучшей выживаемостью пациентов [123].

Ряд исследований показал, что меняется не только количество, но также активность и продолжительность жизни нейтрофилов у больных с различными типами рака [201, 224, 237].

Было установлено, что в периферической крови мышей и, что очень важно, людей со злокачественными опухолями наряду с обычными нейтрофилами, которые традиционно характеризуются высокой плотностью при выделении центрифугированием на градиенте плотностей фикола (high-density neutrophils — HDNs), увеличивается количество нейтрофилов во фракции мононуклеарных клеток (peripheral blood mononuclear cells — PBMC) с низкой плотностью. Такие нейтрофилы были обозначены как нейтрофилы (гранулоциты) низкой плотности (low-density neutrophils — LDNs). LDNs пациентов с раком демонстрировали более высокую экспрессию маркеров CD11b и CD66b в сравнении с HDNs [187]. При функциональной оценке LDNs и HDNs, выделенных от пациентов с опухолями, *in vitro* было установлено, что LDNs обладают меньшей хемотаксической и фагоцитарной активностью, характеризуются нарушением кислородного взрыва и меньшей продукцией H_2O_2 в ответ на форбол-миристал-ацетат (PMA). LDNs также демонстрировали низкую цитотоксичность в отношении опухолевых клеток по сравнению с высокоцитотоксичными HDNs, которые значительно тормозили рост опухоли. Кроме того LDNs характеризовались низкой провоспалительной активностью, включая пониженную экспрессию различных хемокинов (CXCL1, CXCL2, CXCL10, CCL2 и CCL3), хемокиновых рецепторов (CXCR2 и CCR5) и провоспалительных молекул, но повышенной экспрессией CCR7, который экспрессируется на мембране при стимуляции. При этом LDNs демонстрировали супрессорную активность и заметно ограничивали пролиферацию CD3-стимулированных CD8⁺ Т-клеток *in vitro* [187]. Из полученных данных авторами был сделан вывод, что «нормальные» нейтрофилы с высокой плотностью явля-

ются антиопухолевыми, а LDNs ассоциируются с проопухолевой активностью [187]. Кроме того, авторы предположили, что именно соотношение этих функционально противоположных подтипов диктует общее про- или противоопухолевое действие нейтрофилов: на ранних стадиях развития опухоли преобладают HDNs, что приводит к общему противоопухолевому ответу; по мере же прогрессирования опухоли происходит превращение HDNs в LDNs, последние становятся доминирующими, сдвигая ответ в сторону проопухолевого [187]. Авторами была проведена важная параллель: если рак — это хроническое воспаление, то организм пытается постепенно переключать провоспалительные механизмы (в виде HDNs) на те, которые приведут к его разрешению (на LDNs), но драматичность ситуации заключается в том, что опухоль-ассоциированное воспаление никогда не разрешится, а значит продолжающийся рост количества иммуносупрессорных LDNs в итоге будет способствовать росту и прогрессии опухоли. Важно отметить, что популяция LDNs является неоднородной: кроме иммуносупрессорных клеток, количество которых увеличивается при злокачественных новообразованиях, а также при ВИЧ-инфекции и при сепсисе, среди LDNs выявляются клетки с провоспалительным активированным фенотипом, количество которых растет при некоторых аутоиммунных заболеваниях [95].

В более ранних публикациях было показано, что у мышей и людей со злокачественными опухолями в периферической крови появляется гетерогенная популяция незрелых клеток миелоидного происхождения с иммуносупрессорной активностью, которые были названы миелоидными супрессорными клетками (myeloid derived suppressor cells — MDSC) [8, 73, 74, 158, 197, 245]. Изменение физиологического миелопоэза при неопластическом процессе связано с продукцией многочисленных цитокинов, факторов роста, хемокинов клетками опухолевого микроокружения, которые попадают в кровь и лимфу. Среди них ключевыми являются GM-CSF, M-CSF, IL-4, IL-6, IL-18, IL-13, IL-10, TGF- β , простагландины [121, 245]. Было установлено, что у мышей MDSC одновременно экспрессируют CD11b и Gr-1, но состоят из двух основных субпопуляций клеток: моноцитарных (M-MDSC) с фенотипом, близким к фенотипу воспалительных моноцитов (CD11b⁺/Gr-1^{int}/Ly6G⁻/Ly6C^{high}), и гранулоцитарных (или полиморфноядерных) (G-MDSC или PMN-MDSC) с фенотипом, напоминающим нейтрофильный (CD11b⁺/Gr-1^{high}/Ly6G^{high}/Ly6C⁻) [64]. Несмотря на определенную схожесть в поверхностных маркерах с клетками, присутствующими вне опухоли-

вого (патологического) процесса, у MDSC есть очень важное функциональное отличие — это мощная супрессорная активность по отношению к иммунным клеткам, особенно к активированным Т-лимфоцитам [228]. Ингибиторное влияние MDSC на предварительно активированные Т-клетки реализуется через истощение незаменимых аминокислот типа L-аргинина и L-триптофана, продукцию супрессорных цитокинов TGF- β или IL-10, экспрессию молекул типа PD-L1, образование активных форм кислорода (ROS) и азота (RNS) и некоторые другие механизмы [64]. При этом MDSC представляют собой незрелые клетки. М-MDSC и PMN-MDSC у мышей различаются не только по фенотипу, но и по морфологии, экспрессии генов, спектру ингибирующих факторов. Однако было показано, что в условиях *in vitro* и *in vivo* у мышей с опухолями М-MDSC могут дифференцироваться в клетки с фенотипом CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{low}, то есть в PMN-MDSC [244].

В последние годы уделяется большое внимание изучению значению MDSC при злокачественных опухолях у человека. Было установлено, что высокий уровень MDSC коррелирует с плохим прогнозом и низкой выживаемостью пациентов с разными видами рака, а аккумуляция этих клеток способствует прогрессии опухоли [98, 140, 210, 211, 230, 233]. У пациентов с разными локализациями раковых опухолей PMN-MDSC являлась доминирующей популяцией MDSC, и соотношение PMN-MDSC/М-MDSC составляло более 5:1. Кроме того, PMN-MDSC могли также генерироваться *in vitro* из М-MDSC раковых больных [244].

Предпринимались многочисленные попытки для идентификации и фенотипической характеристики MDSC при злокачественных опухолях у человека. Согласно последним данным, MDSC выделяются центрифугированием на градиенте плотности фикола и входят во фракцию клеток с низкой плотностью (PBMC). При этом моноцитарные MDSC человека имеют маркеры CD11b⁺CD14⁺HLA-DR^{-/low}CD15⁻, что делает их похожими на воспалительные моноциты, а гранулоцитарные MDSC обладают фенотипом, очень близким нейтрофильному (CD11b⁺CD14⁻CD15⁺CD66⁺) [32, 45, 64, 140]. Так как G-MDSC (PMN-MDSC) выделяются во фракции клеток с низкой плотностью, схожи с нейтрофилами и обладают иммуносупрессорными свойствами, то, вероятно, их можно отнести к супрессорной субпопуляции LDNs, хотя поставить знак абсолютного равенства между LDNs и G-MDSC нельзя, поскольку среди LDNs встречаются активированные нейтрофилы без супрессорной активности [95]. Кроме того на сегодняшний день нет единого

мнения и продолжают обсуждения взаимоотношений «обычных» нейтрофилов (HDNs), PMN-MDSC и TANs [63].

При этом поиск высоко специфических маркеров и способов идентификации PMN-MDSC человека не останавливается. Так, в недавней публикации было выявлено, что PMN-MDSC и «обычные» нейтрофилы (HDNs) пациентов с разными видами раковых опухолей отличаются профилем экспрессии генов [45]. Наиболее значимые изменения наблюдались в экспрессии генов, ассоциированных со стрессом эндоплазматического ретикулула (ER). При этом было установлено, что человеческие PMN-MDSC экспрессируют лектиноподобный рецептор окисленных липопротеинов низкой плотности 1 (lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 — LOX-1), в то время как «обычные» нейтрофилы пациентов с раком, также как и здоровых доноров, не экспрессируют LOX-1. LOX-1⁺ PMN-MDSC демонстрировали высокую экспрессию аргиназы 1 и продукцию ROS, проявляя супрессорную активность и подавляя пролиферацию Т-лимфоцитов. Поэтому LOX-1 был обозначен как маркер человеческих PMN-MDSC, причем не только в периферической крови, но и непосредственно в опухолевых тканях [45].

Еще раз стоит напомнить, что развитие злокачественных опухолей в организме человека значительно отличается от мышиных моделей. Неопластический процесс проходит много стадий, на каждой из которых взаимодействие TANs с клетками самой опухоли и ее микроокружения меняется, что создает сложности в изучении активности TANs. Кроме того, для исследования TANs человека важную роль играет техника получения клеточных суспензий из опухолевых тканей [63]. В связи с этим число работ, посвященных исследованию TANs человека, относительно немногочисленно.

В ряде публикаций было отмечено, что увеличение количества нейтрофилов, инфильтрирующих опухоль, коррелирует с плохим прогнозом заболевания и низким показателем выживаемости при таких видах опухолей, как плоскоклеточная карцинома головы и шеи [223], карцинома почек [103], колоректальная карцинома [179], гепатоцеллюлярная карцинома [124], меланома [104]. Первые исследования функциональной роли TANs в прогрессии рака были изучены на примере плоскоклеточного рака и аденокарциномы легких человека I–II стадии [62]. TANs были идентифицированы как CD11b⁺CD15^{hi}CD66b⁺MPO⁺Arg1⁺CD16^{int} клетки и составляли 5–25% клеточного состава опухолей. По сравнению с нейтрофилами крови TANs демонстрировали активированный фенотип

(CD62L^{lo}CD54^{hi}) с репертуаром хемокиновых рецепторов, который включал CCR5, CCR7, CXCR3 и CXCR4. TANs продуцировали значительные количества провоспалительных факторов MCP-1, IL-8, MIP-1 α и IL-6, а также противовоспалительный антагонист IL-1R. TANs обладали способностью к фагоцитозу *E. coli* и генерации ROS при стимуляции PMA *in vitro*. Функционально TANs были способны стимулировать пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, активировать CD8⁺ Т-клетки с высвобождением цитотоксического содержимого их гранул, индуцировать продукцию IFN γ . При этом способность TANs стимулировать пролиферацию Т-лимфоцитов зависела от прямого контакта между этими клетками, и TANs демонстрировали поверхностную экспрессию костимулирующих молекул CD54, CD86, OX40L и 4-1BBL (но не CD80 и CD40). В свою очередь активированные Т-клетки при совместном культивировании с TANs *in vitro* увеличивали срок жизни последних и значительно усиливали экспрессию костимулирующих молекул CD54, CD86, OX40L и 4-1BBL на их поверхности. Интересно, что стимулирующий эффект в отношении пролиферации Т-лимфоцитов был значительно выше у TANs из опухолей с размером < 3 см, чем у TANs из более крупных опухолевых узлов. Из всех полученных результатов авторами был сделан вывод, что на ранних стадиях рака легких TANs являются скорее не иммуносупрессорными, а стимулирующими противоопухолевой Т-клеточный ответ [62].

В более поздних работах этими же авторами было установлено, что при немелкоклеточном раке легких человека I-II стадии кроме «классических TANs», экспрессирующих маркеры нейтрофилов CD11b⁺CD15^{hi}CD66b⁺, в опухоли встречаются TANs с одновременной дополнительной поверхностной экспрессией HLA-DR, CD14, CD206, CD86 и CCR7, которые характерны для антигенпрезентирующих клеток (APC). Такая разновидность TANs была обозначена как «APC-подобные гибридные TANs» [204]. Гибридные TANs совмещали в себе функции нейтрофилов и профессиональных APC и значительно усиливали активность эффекторных противоопухолевых Т-клеток. При этом процент гибридных TANs был значительно меньше в крупных опухолевых узлах (> 3 см), чем в мелких (< 3 см), полностью исчезая при размере опухоли более 5–7 см. Основными (но не единственными) опухоль-продуцируемыми цитокинами, индуцирующими образование гибридных TANs, авторы определили GM-CSF и IFN γ : в опухолях с большой долей гибридных TANs (> 10% от всех TANs) уровень этих цитокинов

был достоверно выше. Из всех полученных данных авторами опять-таки был сделан вывод, что микроокружение на ранних стадиях развития опухоли способствует дифференциации TANs с антитуморогенной активностью. Кроме того, авторы предложили модель дифференцировки TANs на ранних стадиях рака легких человека, согласно которой зрелые нейтрофилы, рекрутируемые в опухоль из крови, приобретают фенотип высокоактивных нейтрофилов и образуют популяцию «классических TANs»; незрелые нейтрофилы, которые в разном количестве циркулируют в крови больных раком, более пластичны. Когда незрелые нейтрофилы попадают в опухоль, продуцирующие соответствующие уровни IFN γ и GM-CSF, они меняют свою программу дифференцировки и образуют популяцию «APC-подобных гибридных TANs». Однако если уровень IFN γ и GM-CSF не является достаточным или в опухоли присутствуют какие-либо ингибирующие факторы (например, гипоксия), незрелые нейтрофилы используют канонический путь и дифференцируются в «классические TANs» [204]. Для более детального изучения и понимания роли TANs требуется продолжение исследования опухолей III и IV стадии. Однако при таком распространенном процессе редко проводится хирургическое вмешательство, что создает соответствующие трудности в получении материала для исследования [63].

Недавно были опубликованы результаты исследования роли опухоль-инфильтрирующих нейтрофилов человека при раке желудка [234]. Было показано, что увеличение количества нейтрофилов, инфильтрирующих опухоль, коррелирует с прогрессированием опухоли и плохим прогнозом. При этом опухолевые нейтрофилы демонстрировали высокую экспрессию маркера активации CD54 и иммуносупрессорной молекулы PD-L1, чему способствовали факторы, выделяемые микроокружением опухоли, и в первую очередь GM-CSF. При совместном культивировании *in vitro* опухоль-инфильтрирующие нейтрофилы подавляли пролиферацию Т-лимфоцитов и продукцию ими IFN γ PD-L1-PD-1-зависимым способом, а повышенное количество PD-L1⁺ нейтрофилов в опухоли коррелировало с ее прогрессией и плохим прогнозом. При этом способность активированных PD-L1⁺ нейтрофилов супрессировать Т-клеточный иммунитет и вызывать прогрессию опухоли была проверена на мышах, которым вводились клетки аденокарциномы желудка линии SGC-7901. Основываясь на полученных данных, авторы предложили модель прогрессии рака желудка, согласно которой опухоль-продуцируемый GM-CSF индуцирует активацию внутрипу-

холовых нейтрофилов, что сопровождается индукцией экспрессии PD-L1 на этих клетках посредством активации сигнального пути JAK-STAT3; затем эти активированные иммуносупрессорные нейтрофилы оказывают проопухоловое действие путем подавления функции Т-клеток опухолевого микроокружения PD-L1-PD-1-зависимым образом [234].

Подводя итог, нужно сказать, что, безусловно, все полученные за последние 2–3 декады сведения о функциональных возможностях нейтрофильных гранулоцитов и молекулярных механизмах их реализации в условиях гомеостаза и при различных видах патологии заметно углубляют наше понимание функционирования иммунной системы в целом

и открывают колоссальные перспективы для разработки новых препаратов для таргетной иммунотерапии. Нейтрофилы демонстрируют способность проявлять разнообразные, порой даже антагонистические варианты воздействия на другие иммунные клетки, что свидетельствует об их пластичности и, вероятно, гетерогенности. И хотя многие данные получены в условиях *in vitro* или в моделях на животных и поэтому требуют дополнительного изучения и подтверждения, однозначно можно констатировать, что влияние нейтрофилов не ограничивается рамками врожденного иммунитета. Эти многофункциональные клетки активно участвуют в формировании антигенспецифического иммунного ответа.

Список литературы/References

1. Долгушин И.И., Андреева Ю.С., Савочкина А.Ю. Нейтрофильные внеклеточные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов. М.: Издательство РАМН. 2009. 208 с. [Dolgushin I.I., Andreeva Yu.S., Savochkina A.Yu. Neutrophil extracellular traps and methods for assessing the functional status of neutrophils. Moscow: Publishing house of RAMS, 2009. 208 p. (In Russ.)]
2. Куликов В.А., Гребенников И.Н. Резольвины, протектины и мазерины: новые медиаторы воспаления // Вестник Витебского государственного медицинского университета. 2012. Т. 11, № 1. С. 25–30. [Kulikov V.A., Grebennikov I.N. Resolvins, protectins and maresins as new mediators of an inflammation. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta = Herald of Vitebsk State Medical University*, 2012, vol. 11, no. 1, pp. 25–30. (In Russ.)]
3. Кунц Т.А., Михайлова Е.С., Маринкин И.О., Вараксин Н.А., Аутеншлюс А.И. Сравнительная оценка продукции цитокинов иммунокомпетентными клетками крови и опухоли в различных возрастных группах больных инвазивным протоковым раком молочной железы // Медицинская иммунология. 2017. Т. 19, № 5. С. 567–576. [Kunts T.A., Mikhaylova E.S., Marinkin I.O., Varaksin N.A., Autenshlyus A.I. Comparative analysis of cytokine production by blood immunocompetent cells and tumor in different age groups of patients with invasive ductal carcinoma. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, vol. 19, no. 5, pp. 567–576. (In Russ.)]
4. Недоспасов С.А. Врожденный иммунитет и его значение для биологии и медицины // Вестник Российской академии наук. 2013. Т. 83, № 9. С. 771–783. [Nedospasov S.A. Innate immunity and its importance for biology and medicine. *Vestnik Rossiyskoy akademii nauk = Herald of the Russian Academy of Sciences*, 2013, vol. 83, no. 9, pp. 771–783. (In Russ.)]
5. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А. Нейтрофильные гранулоциты: новый взгляд на «старых игроков» на иммунологическом поле // Иммунология. 2015. Т. 36, № 4. С. 257–265. [Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtadidze L.V., Kovaleva S.V., Evglevsky A.A. Neutrophilic granulocytes: a new look at “old players” on the immunological field. *Immunologiya = Immunology*, 2015, vol. 36, no. 4, pp. 257–265. (In Russ.)]
6. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А., Нгуен Т.З.Л. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. Часть 1 // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 3. С. 219–230. [Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtadidze L.V., Kovaleva S.V., Evglevsky A.A., Nguyen T.D.L. The new look at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas. Part 1. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, vol. 7, no. 3, pp. 219–230. doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-219-230 (In Russ.)]
7. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А., Нгуен Т.З.Л. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. Часть 2 // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 1. С. 7–18. [Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtadidze L.V., Kovaleva S.V., Evglevsky A.A., Nguyen T.D.L. The new look at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas. Part 2. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2018, vol. 8, no. 1, pp. 7–18. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-7-18 (In Russ.)]
8. Пономарев А.В. Миелоидные супрессорные клетки: общая характеристика // Иммунология. 2016. Т. 37, № 1. С. 47–50. [Ponomarev A.V. Myeloid suppressors cells: general characteristics. *Immunologiya = Immunology*, 2016, vol. 37, no. 1, pp. 47–50. (In Russ.)]
9. Потапнев М.П. Молекулярные аспекты распознавания в иммунном и воспалительном ответе // Здоровье (Минск). 2014. № 5. С. 18–27. [Potapnev M.P. Molecular aspects of recognizing in immune and inflammatory responses. *Zdravookhraneniye (Minsk) = Public Health (Minsk)*, 2014, no. 5, pp. 18–27. (In Russ.)]
10. Сахаров В.Н., Литвицкий П.Ф. Роль различных фенотипов макрофагов в развитии заболеваний человека // Вестник Российской академии медицинских наук. 2015. Т. 70, № 1. С. 26–31. [Sakharov V.N., Litvitsky P.F. Roles of different macrophage phenotypes in the pathogenesis of some human diseases. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2015, vol. 70, no. 1, pp. 26–31. (In Russ.)]

11. Сенников С.В., Куликова Е.В., Кнауэр Н.Ю., Хантакова Ю.Н. Молекулярно-клеточные механизмы, опосредуемые дендритными клетками, участвующие в индукции толерантности // Медицинская иммунология. 2017. Т. 19, № 4. С. 359–374. [Sennikov S.V., Kulikova E.V., Knauer N.Yu., Khantakova Yu.N. Molecular and cellular mechanisms mediated by dendritic cells involved in the induction of tolerance. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, vol. 19, no. 4, pp. 359–374. (In Russ.)]
12. Талаев В.Ю., Плеханова М.В., Матвейчев А.В. Экспериментальные модели, пригодные для оценки влияния компонентом новых разрабатываемых вакцин на дифференцировку дендритных клеток // Журнал МедиАль. 2014. № 2 (12). С. 135–153. [Talayev V.Yu., Plechanova M.V., Matveichev A.V. In vitro models for investigation of vaccine component action upon dendritic cell maturation. *Zhurnal Medial' = Magazine Medial*, 2014, no. 2 (12), pp. 135–153. (In Russ.)]
13. Хаитов Р.М., Пашенков М.В., Пинегин Б.В. Роль паттерн-распознающих рецепторов во врожденном и адаптивном иммунитете // Иммунология. 2009. Т. 30, № 1. С. 66–76. [Khaitov R.M., Pashchenkov M.V., Pinegin B.V. The role of pattern-recognizing receptors in congenital and adaptive immunity. *Immunologiya = Immunology*, 2009, vol. 30, no.1, pp. 66–76. (In Russ.)]
14. Abadie V., Badell E., Douillard P., Ensergueix D., Leenen P.J., Tanguy M., Fiette L., Saeland S., Gicquel B., Winter N. Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after Mycobacterium bovis BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. *Blood*, 2005, vol. 106, no. 5, pp. 1843–1850.
15. Aldinucci D., Colombatti A. The inflammatory chemokine CCL5 and cancer progression. *Mediators Inflamm.*, 2014, vol. 2014: 292376, 12 p. doi: 10.1155/2014/292376
16. Anderson R., Tintinger G.R., Feldman C. Inflammation and cancer: the role of the human neutrophil. *South Africa J. Science*, 2014, vol. 110, no. 1/2, 6 p.
17. Andzinski L., Kasnitz N., Stahnke S., Wu C.F., Gereke M., von Kockritz-Blickwede M., Schilling B., Brandau S., Weiss S., Jablonska J. Type I IFNs induce anti-tumor polarization of tumor associated neutrophils in mice and human. *Int. J. Cancer*, 2016, vol. 138, no. 8, pp. 1982–1993. doi: 10.1002/ijc.29945
18. Avondt K.V., Hartl D. Mechanisms and disease relevance of neutrophil extracellular trap formation. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2018, e12919. doi: 10.1111/eci.12919
19. Bank U., Reinhold D., Schneemilch C., Kunz D., Synowitz H.J., Ansorge S. Selective proteolytic cleavage of IL-2 receptor and IL-6 receptor ligand binding chains by neutrophil-derived serine proteases at foci of inflammation. *J. Interferon Cytokine Res.*, 1999, vol. 19, no. 11, pp. 1277–1287.
20. Bankey P.E., Banerjee S., Zucchiatti A., De M., Sleem R.W., Lin C.F., Miller-Graziano C.L., De A.K. Cytokine induced expression of programmed death ligands in human neutrophils. *Immunol. Lett.*, 2010, vol. 129, no. 2, pp. 100–107. doi: 10.1016/j.imlet.2010.01.006
21. Barrientos L., Bignon A., Gueguen C., de Chaisemartin L., Gorges R., Sandré C., Mascarell L., Balabanian K., Kerdine-Römer S., Pallardy M., Marin-Esteban V., Chollet-Martin S. Neutrophil extracellular traps downregulate lipopolysaccharide-induced activation of monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.*, 2014, vol. 193, no. 11, pp. 5689–5698. doi: 10.4049/jimmunol.1400586
22. Basil M.C., Levy B.D. Specialized pro-resolving mediators: endogenous regulators of infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2016, vol. 16, no. 1, pp. 51–67. doi: 10.1038/nri.2015.4
23. Beauvillain C., Cunin P., Doni A., Scotet M., Jaillon S., Loiry M.L., Magistrelli G., Masternak K., Chevailler A., Delneste Y., Jeannin P. CCR7 is involved in the migration of neutrophils to lymph nodes. *Blood*, 2011, vol. 117, no. 4, pp. 1196–1204. doi: 10.1182/blood-2009-11-254490
24. Bekes E.M., Schweighofer B., Kupriyanova T.A., Zajac E., Ardi V.C., Quigley J.P., Deryugina E.I. Tumor-recruited neutrophils and neutrophil TIMP-free MMP-9 regulate coordinately the levels of tumor angiogenesis and efficiency of malignant cell intravasation. *Am. J. Pathol.*, 2011, vol. 179, no. 3, pp. 1455–1470. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.05.031
25. Bennouna S., Bliss S.K., Curiel T.J., Denkers E.Y. Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *J. Immunol.*, 2003, vol. 171, no. 11, pp. 6052–6058.
26. Bennouna S., Denkers E.Y. Microbial antigen triggers rapid mobilization of TNF- α to the surface of mouse neutrophils transforming them into inducers of high-level dendritic cell TNF- α production. *J. Immunol.*, 2005, vol. 174, no. 8, pp. 4845–4851.
27. Berger-Achituv S., Brinkmann V., Abu Abed U., Kühn L.I., Ben-Ezra J., Elhasid R., Zychlinsky A. A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoediting. *Front. Immunol.*, 2013, vol. 4: 48. doi: 10.3389/fimmu.2013.00048
28. Beyer M., Schultze J.L. Regulatory T cells: major players in the tumor microenvironment. *Curr. Pharm. Des.*, 2009, vol. 15, no. 16, pp. 1879–1892.
29. Blomgran R., Desvignes L., Briken V., Ernst J.D. Mycobacterium tuberculosis inhibits neutrophil apoptosis, leading to delayed activation of naive CD4 T cells. *Cell Host Microbe*, 2012, vol. 11, no. 1, pp. 81–90. doi: 10.1016/j.chom.2011.11.012
30. Blomgran R., Ernst J.D. Lung neutrophils facilitate activation of naive antigen-specific CD4+ T cells during Mycobacterium tuberculosis infection. *J. Immunol.*, 2011, vol. 186, no. 12, pp. 7110–7119. doi: 10.4049/jimmunol.1100001
31. Bosurgi L., Cao Y.G., Cabeza-Cabrerizo M., Tucci A., Hughes L.D., Kong Y., Weinstein J.S., Liconia-Limon P., Schmid E.T., Pelorosso F., Gagliani N., Craft J.E., Flavell R.A., Ghosh S., Rothlin C.V. Macrophage function in tissue repair and remodeling requires IL-4 or IL-13 with apoptotic cells. *Science*, 2017, vol. 356, no. 6342, pp. 1072–1076. doi:10.1126/science.aai8132.
32. Bronte V., Brandau S., Chen S.H., Colombo M.P., Frey A.B., Greten T.F., Mandruzzato S., Murray P.J., Ochoa A., Ostrand-Rosenberg S., Rodriguez P.C., Sica A., Umansky V., Vonderheide R.H., Gabrilovich D.I. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat. Commun.*, 2016, vol. 7: 12150. doi: 10.1038/ncomms12150
33. Buckley C.D., Ross E.A., McGettrick H.M., Osborne C.E., Haworth O., Schmutz C., Stone P.C., Salmon M., Matharu N.M., Vohra R.K., Nash G.B., Rainger G.E. Identification of a phenotypically and functionally distinct population of longlived neutrophils in a model of reverse endothelial migration. *J. Leukoc. Biol.*, 2006, vol. 79, no. 2, pp. 303–311.

34. Candido J., Hagemann T. Cancer-related inflammation. *J. Clin. Immunol.*, 2013, vol. 33, suppl. 1, pp. 79–84. doi: 10.1007/s10875-012-9847-0
35. Cerutti A., Cols M., Puga I. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody producing lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.*, 2013, vol. 13, no. 2, pp. 118–132. doi: 10.1038/nri3383
36. Charmoy M., Brunner-Agten S., Aebischer D., Auderset F., Launois P., Milon G., Proudfoot A.E., Tacchini-Cottier F. Neutrophil derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of Leishmania major inoculation in resistant mice. *PLoS Pathog.*, 2010, vol. 6, no. 2:e1000755. doi: 10.1371/journal.ppat.1000755
37. Chertov O., Ueda H., Xu L.L., Tani K., Murphy W.J., Wang J.M., Howard O.M.Z., Sayers T.J., Oppenheim J.J. Identification of human neutrophil-derived cathepsin G and azurocidin/CAP37 as chemoattractants for mononuclear cells and neutrophils. *J. Exp. Med.*, 1997, vol. 186, no. 5, pp. 739–747.
38. Chopin M., Allan R.S., Belz G.T. Transcriptional regulation of dendritic cell diversity. *Front. Immunol.*, 2012, vol. 3: 26. doi: 10.3389/fimmu.2012.00026
39. Christofferson G., Phillipson M. The neutrophil: one cell on many missions or many cells with different agendas? *Cell Tissue Res.*, 2018, vol. 371, no. 3, pp. 415–423.
40. Chtanova T., Schaeffer M., Han S.J., van Dooren G.G., Nollmann M., Herzmark P., Chan S.W., Satija H., Camfield K., Aaron H., Striepen B., Robey E.A. Dynamics of neutrophil migration in lymph nodes during infection. *Immunity*, 2008, vol. 29, no. 3, pp. 487–496. doi: 10.1016/j.immuni.2008.07.012
41. Clayton A.R., Prue R.L., Harper L., Drayson M.T., Savage C.O. Dendritic cell uptake of human apoptotic and necrotic neutrophils inhibits CD40, CD80, and CD86 expression and reduces allogeneic T cell responses: relevance to systemic vasculitis. *Arthritis Rheumatol.*, 2003, vol. 48, no. 8, pp. 2362–2374.
42. Clynes R.A., Towers T.L., Presta L.G., Ravetch J.V. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat. Med.*, 2000, vol. 6, no. 4, pp. 443–446.
43. Collin M., McGovern N., Haniffa M. Human dendritic cell subsets. *Immunology*, 2013, vol. 140, no. 1, pp. 22–30. doi: 10.1111/imm.12117
44. Colom B., Bodkin J.V., Beyrau M., Woodfin A., Ody C., Rourke C., Chavakis T., Brohi K., Imhof B.A., Nourshargh S. Leukotriene B4-neutrophil elastase axis drives neutrophil reverse transendothelial cell migration in vivo. *Immunity*, 2015, vol. 42, no. 6, pp. 1075–1086. doi: 10.1016/j.immuni.2015.05.010
45. Condamine T., Dominguez G.A., Youn J.I., Kossenkov A.V., Mony S., Alicea-Torres K., Tcyganov E., Hashimoto A., Nefedova Y., Lin C., Partlova S., Garfall A., Vogl D.T., Xu X., Knight S.C., Malietzis G., Lee G.H., Eruslanov E., Albelda S.M., Wang X., Mehta J.L., Bewtra M., Rustgi A., Hockstein N., Witt R., Masters G., Nam B., Smirnov D., Sepulveda M.A., Gabrilovich D.I. Lectin-type oxidized LDL receptor-1 distinguishes population of human polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. *Sci. Immunol.*, 2016, vol. 1, no. 2, pp. aaf8943. doi: 10.1126/sciimmunol.aaf8943
46. Cools-Lartigue J., Spicer J., Najmeh S., Ferri L. Neutrophil extracellular traps in cancer progression. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2014, vol. 71, no. 21, pp. 4179–4194. doi: 10.1007/s00018-014-1683-3
47. Cools-Lartigue J., Spicer J., McDonald B., Gowing S., Chow S., Giannias B., Bourdeau F., Kubes P., Ferri L. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J. Clin. Invest.*, 2013, vol. 123, no. 8, pp. 3446–3458. doi: 10.1172/JCI67484
48. Cross A., Bucknall R.C., Cassatella M.A., Edwards S.W., Moots R.J. Synovial fluid neutrophils transcribe and express class II major histocompatibility complex molecules in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.*, 2003, vol. 48, no. 10, pp. 2796–2806.
49. Culter C.W., Jotwani R. Dendritic cells at the oral mucosal interface. *J. Dent. Res.*, 2006, vol. 85, no. 8, pp. 678–689.
50. Dallegri F., Ottonello L., Ballestrero A., Dapino P., Ferrando F., Patrone F., Sacchetti C. Tumor cell lysis by activated human neutrophils: analysis of neutrophil-delivered oxidative attack and role of leukocyte function-associated antigen 1. *Inflammation*, 1991, vol. 15, no. 1, pp. 15–30.
51. Dalli J., Serhan C.N. Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators. *Blood*, 2012, vol. 120, no. 15, pp. e60–e72. doi: 10.1182/blood-2012-04-423525
52. De Filippo K., Henderson R.B., Laschinger M., Hogg N. Neutrophil chemokines KC and macrophage-inflammatory protein-2 are newly synthesized by tissue macrophages using distinct TLR signaling pathways. *J. Immunol.*, 2008, vol. 180, no. 6, pp. 4308–4315.
53. De Kleijn S., Langereis J.D., Leentjens J., Kox M., Netea M.G., Koenderman L., Ferwerda G., Pickkers P., Hermans P.W. IFN γ -stimulated neutrophils suppress lymphocyte proliferation through expression of PD-L1. *PLoS ONE*, 2013, vol. 8, no. 8: e72249. doi: 10.1371/journal.pone.0072249
54. De Lorenzo B.H., Godoy L.C., Novaes e Brito R.R., Pagano R.L., Amorim-Dias M.A., Grosso D.M., Lopes J.D., Mariano M. Macrophage suppression following phagocytosis of apoptotic neutrophils is mediated by the S100A9 calcium-binding protein. *Immunobiology*, 2010, vol. 215, no. 5, pp. 341–347. doi: 10.1016/j.imbio.2009.05.013
55. Deryugina E.I., Zajac E., Juncker-Jensen A., Kupriyanova T.A., Welter L., Quigley J.P. Tissue-infiltrating neutrophils constitute the major in vivo source of angiogenesis-inducing MMP-9 in the tumor microenvironment. *Neoplasia*, 2014, vol. 16, no. 10, pp. 771–788. doi: 10.1016/j.neo.2014.08.013
56. Doherty T.M., Kastelein R., Menon S., Andrade S., Coffman R.L. Modulation of murine macrophage function by IL-13. *J. Immunol.*, 1993, vol. 151, no. 12, pp. 7151–7160.
57. Doyle A.G., Herbein G., Montaner L.J., Minty A.J., Caput D., Ferrara P., Gordon S. Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: comparison with interleukin-4 and interferon-gamma. *Eur. J. Immunol.*, 1994, vol. 24, no. 6, pp. 1441–1445.
58. Dvorak H.F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *New Engl. J. Med.*, 1986, vol. 315, pp. 1650–1659.
59. Eken C., Gasser O., Zenhausern G., Oehri I., Hess C., Schifferli J.A. Polymorphonuclear neutrophil-derived ectosomes interfere with the maturation of monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.*, 2008, vol. 180, no. 2, pp. 817–824.

60. Erler J.T., Bennewith K.L., Cox T.R., Lang G., Bird D., Koong A., Le Q.T., Giaccia A.J. Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer Cell*, 2009, vol. 15, no. 1, pp. 35–44. doi: 10.1016/j.ccr.2008.11.012
61. Erpenbeck L., Schön M.P. Neutrophil extracellular traps: protagonists of cancer progression? *Oncogene*, 2017, vol. 36, no. 18, pp. 2483–2490. doi: 10.1038/onc.2016.406
62. Eruslanov E.B., Bhojnagarwala P.S., Quatromoni J.G., Stephen T.L., Ranganathan A., Deshpande C., Akimova T., Vachani A., Litzky L., Hancock W.W., Conejo-Garcia J.R., Feldman M., Albelda S.M., Singhal S. Tumor-associated neutrophils stimulate T cell responses in early-stage human lung cancer. *J. Clin. Invest.*, 2014, vol. 124, no. 12, pp. 5466–5480. doi: 10.1172/JCI77053
63. Eruslanov E.B., Singhal S., Albelda S.M. Mouse versus human neutrophils in cancer: a major knowledge gap. *Trends Cancer*, 2017, vol. 3, no. 2, pp. 149–160. doi: 10.1016/j.trecan.2016.12.006
64. Escors D., Kochan G. Myeloid-derived suppressor cells and their “inconvenient” plasticity. *J. Immunol. Sci.*, 2018, vol. 2, no. 2, pp. 42–47.
65. Ethuin F., Gerard B., Benna J.E., Boutten A., Gougereot-Pocidallo M.A., Jacob L., Chollet-Martin S. Human neutrophils produce interferon gamma upon stimulation by interleukin-12. *Lab. Invest.*, 2004, vol. 84, no. 10, pp. 1363–1371.
66. Fadok V.A., Bratton D.L., Konowal A., Freed P.W., Westcott J.Y., Henson P.M. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J. Clin. Invest.*, 1998, vol. 101, no. 4, pp. 890–898.
67. Fanger N.A., Liu C., Guyre P.M., Wardwell K., O’Neil J., Guo T.L., Christian T.P., Mudzinski S.P., Gosselin E.J. Activation of human T cells by major histocompatibility complex class II expressing neutrophils: proliferation in the presence of superantigen, but not tetanus toxoid. *Blood*, 1997, vol. 89, no. 11, pp. 4128–4135.
68. Farrera C., Fadeel B. Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process. *J. Immunol.*, 2013, vol. 191, no. 5, pp. 2647–2656. doi: 10.4049/jimmunol.1300436
69. Feldmeyer N., Wabnitz G., Leicht S., Luckner-Minden C., Schiller M., Franz T., Conradi R., Kropf P., Müller I., Ho A.D., Samstag Y., Munder M. Arginine deficiency leads to impaired cofilin dephosphorylation in activated human T lymphocytes. *Int. Immun.*, 2012, vol. 24, no. 5, pp. 303–313. doi: 10.1093/intimm/dxs004
70. Fletcher M., Ramirez M.E., Sierra R.A., Raber P., Thevenot P., Al-Khami A.A., Sanchez-Pino D., Hernandez C., Wyczechowska D.D., Ochoa A.C., Rodriguez P.C. L-arginine depletion blunts antitumor T-cell responses by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.*, 2015, vol. 75, no. 2, pp. 275–283. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1491
71. Fridlender Z.G., Albelda S.M. Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis*, 2012, vol. 33, no. 5, pp. 949–955. doi: 10.1093/carcin/bgs123
72. Fridlender Z.G., Sun J., Kim S., Kapoor V., Cheng G., Ling L., Worthen G.S., Albelda S.M. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell*, 2009, vol. 16, no. 3, pp. 183–194. doi: 10.1016/j.ccr.2009.06.017
73. Gabrilovich D. I., Bronte V., Chen S.H., Colombo M. P., Ochoa A., Ostrand-Rosenberg S., Schreiber H. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.*, 2007, vol. 67, no. 1, pp. 425–426.
74. Gabrilovich D. I., Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.*, 2009, vol. 9, no. 3, pp. 162–174. doi: 10.1038/nri2506
75. Garcia-Romo G.S., Caielli S., Vega B., Connolly J., Allantaz F., Xu Z., Punaro M., Baisch J., Guiducci C., Coffman R.L., Barrat F.J., Banchereau J., Pascual V. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.*, 2011, vol. 3, no. 73, pp. 73ra20. doi: 10.1126/scitranslmed.3001201
76. Gasser O., Schifferli J.A. Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood*, 2004, vol. 104, no. 8, pp. 2543–2548.
77. Gaudry M., Brégerie O., Andrieu V., El Benna J., Pocidallo M.A., Hakim J. Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils. *Blood*, 1997, vol. 90, no. 10, pp. 4153–4161.
78. Gautam N., Olofsson A.M., Herwald H., Iversen L.F., Lundgren-Akerlund E., Hedqvist P., Arfors K.E., Flodgaard H., Lindbom L. Heparin-binding protein (HBP/CAP37): a missing link in neutrophil-evoked alteration of vascular permeability. *Nat. Med.*, 2001, vol. 7, pp. 1123–1127.
79. Gershkovitz M., Caspi Y., Fainsod-Levi T., Katz B., Michaeli J., Khawaled S., Lev S., Polyansky L., Shaul M.E., Sionov R.V., Cohen-Daniel L., Aqeilan R.I., Shaul Y.D., Mori Y., Karni R., Fridlender Z.G., Binshtok A.M., Granot Z. TRPM2 mediates neutrophil killing of disseminated tumor cells. *Cancer Res.*, 2018, vol. 78, no. 10, pp. 2680–2690. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-3614
80. Gestermann N., Di Domizio J., Lande R., Demaria O., Frasca L., Feldmeyer L., Di Lucca J., Gilliet M. Netting neutrophils activate autoreactive B cells in lupus. *J. Immunol.*, 2018, vol. 200, no. 10, pp. 3364–3371. doi: 10.4049/jimmunol.1700778
81. Gosselin E.J., Wardwell K., Rigby W.F., Guyre P.M. Induction of MHC class II on human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, IFN-gamma, and IL-3. *J. Immunol.*, 1993, vol. 151, no. 3, pp. 1482–1490.
82. Granot Z., Henke E., Comen E.A., King T.A., Norton L., Benezra R. Tumor entrained neutrophils inhibit seeding in the premetastatic lung. *Cancer Cell*, 2011, vol. 20, no. 3, pp. 300–314. doi: 10.1016/j.ccr.2011.08.012
83. Grigg J.M., Savill J.S., Sarraf C., Haslett C., Silverman M. Neutrophil apoptosis and clearance from neonatal lungs. *Lancet*, 1991, vol. 338, no. 8769, pp. 720–722.
84. Grohmann U., Bronte V. Control of immune response by amino acid metabolism. *Immunol. Rev.*, 2010, vol. 236, no. 1, pp. 236–243. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00915.x
85. Grosse-Steffen T., Giese T., Giese N., Longerich T., Schirmacher P., Hänsch G.M., Gaida M.M. Epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic ductal adenocarcinoma and pancreatic tumor cell lines: the role of neutrophils and neutrophil-derived elastase. *Clin. Dev. Immunol.*, 2012, vol. 2012: 720768, 12 p. doi: 10.1155/2012/720768
86. Halverson T.W., Wilton M., Poon K.K., Petri B., Lewenza S. DNA is an antimicrobial component of neutrophil extracellular traps. *PLoS Pathog.*, 2015, vol. 11, no. 1: e1004593. doi: 10.1371/journal.ppat.1004593

87. Hamilton T.A., Zhao C., Pavicic P.G. Jr, Datta S. Myeloid colony-stimulating factors as regulators of macrophage polarization. *Front. Immunol.*, 2014, vol. 5:554. doi: 10.3389/fimmu.2014.00554
88. Hampton H.R., Chtanova T. The lymph node neutrophil. *Semin. Immunol.*, 2016, vol. 28, no. 2, pp. 129–136. doi: 10.1016/j.smim.2016.03.008
89. Hampton H.R., Bailey J., Tomura M., Brink R., Chtanova T. Microbe-dependent lymphatic migration of neutrophils modulates lymphocyte proliferation in lymph nodes. *Nat. Commun.*, 2015, vol. 6: 7139. doi: 10.1038/ncomms8139
90. Hamza B., Wong E., Patel S., Cho H., Martel J., Irimia D. Retrotaxis of human neutrophils during mechanical confinement inside microfluidic channels. *Integr. Biol.*, 2014, vol. 6, no. 2, pp. 175–183. doi: 10.1039/c3ib40175h
91. Hänsch G.M., Radsak M., Wagner C., Reis B., Koch A., Breitbart A., Andrassy K. Expression of major histocompatibility class II antigens on polymorphonuclear neutrophils in patients with Wegener's granulomatosis. *Kidney Int.*, 1999, vol. 55, no. 5, pp. 1811–1818.
92. Himmel M.E., Crome S.Q., Ivison S., Piccirillo C., Steiner T.S., Levings M.K. Human CD4+FOXP3+ regulatory T cells produce CXCL8 and recruit neutrophils. *Eur. J. Immunol.*, 2011, vol. 41, no. 2, pp. 306–312. doi: 10.1002/eji.201040459
93. Hock B.D., Taylor K.G., Cross N.B., Kettle A.J., Hampton M.B., McKenzie J.L. Effect of activated human polymorphonuclear leucocytes on T lymphocyte proliferation and viability. *Immunology*, 2012, vol. 137, no. 3, pp. 249–258. doi: 10.1111/imm.12004
94. Honda M., Takeichi T., Hashimoto S., Yoshii D., Isono K., Hayashida S., Ohya Y., Yamamoto H., Sugawara Y., Inomata Y. Intravital imaging of neutrophil recruitment reveals the efficacy of FPR1 blockade in hepatic ischemia-reperfusion injury. *J. Immunol.*, 2017, vol. 198, no. 4, pp. 1718–1728. doi: 10.4049/jimmunol.1601773
95. Hong C.W. Current understanding in neutrophil differentiation and heterogeneity. *Immune Netw.*, 2017, vol. 17, no. 5, pp. 298–306. doi: 10.4110/in.2017.17.5.298
96. Houghton A.M., Rzymkiewicz D.M., Ji H., Gregory A.D., Egea E.E., Metz H.E., Stolz D.B., Land S.R., Marconcini L.A., Kliment C.R., Jenkins K.M., Beaulieu K.A., Mouded M., Frank S.J., Wong K.K., Shapiro S.D. Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. *Nat. Med.*, 2010, vol. 16, no. 2, pp. 219–223. doi: 10.1038/nm.2084
97. Hu P., Shen M., Zhang P., Zheng C., Pang Z., Zhu L., Du J. Intratumoral neutrophil granulocytes contribute to epithelial-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma cells. *Tumor Biology*, 2015, vol. 36, no. 10, pp. 7789–7796. doi: 10.1007/s13277-015-3484-1
98. Huang A., Zhang B., Wang B., Zhang F., Fan K.X., Guo Y.J. Increased CD14(+)/HLA-DR (-/low) myeloid-derived suppressor cells correlate with extrathoracic metastasis and poor response to chemotherapy in non-small cell lung cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2013, vol. 62, no. 9, pp. 1439–1451. doi: 10.1007/s00262-013-1450-6
99. Huh S.J., Liang S., Sharma A., Dong C., Robertson G.P. Transiently entrapped circulating tumor cells interact with neutrophils to facilitate lung metastasis development. *Cancer Res.*, 2010, vol. 70, no. 14, pp. 6071–6082. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4442
100. Iking-Konert C., Vogt S., Radsak M., Wagner C., Hänsch G.M., Andrassy K. Polymorphonuclear neutrophils in Wegener's granulomatosis acquire characteristics of antigen presenting cells. *Kidney Int.*, 2001, vol. 60, no. 6, pp. 2247–2262.
101. Jablonska J., Leschner S., Westphal K., Lienenklaus S., Weiss S. Neutrophils responsive to endogenous IFN-beta regulate tumor angiogenesis and growth in a mouse tumor model. *J. Clin. Invest.*, 2010, vol. 120, no. 4, pp. 1151–1164. doi: 10.1172/JCI37223
102. Jenne C.N., Liao S., Singh B. Neutrophils: multitasking first responders of immunity and tissue homeostasis. *Cell Tissue Res.*, 2018, vol. 371, no. 3, pp. 395–397. doi: 10.1007/s00441-018-2802-5
103. Jensen H.K., Donskov F., Marcussen N., Nordmark M., Lundbeck F., von der Maase H. Presence of intratumoral neutrophils is an independent prognostic factor in localized renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, 2009, vol. 27, no. 28, pp. 4709–4717. doi: 10.1200/JCO.2008.18.9498
104. Jensen T.O., Schmidt H., Møller H.J., Donskov F., Høyer M., Sjoegren P., Christensen I.J., Steiniche T. Intratumoral neutrophils and plasmacytoid dendritic cells indicate poor prognosis and are associated with pSTAT3 expression in AJCC stage I/II melanoma. *Cancer*, 2012, vol. 118, no. 9, pp. 2476–2485. doi: 10.1002/cncr.26511
105. Joyce J.A., Pollard J.W. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer*, 2009, vol. 9, no. 4, pp. 239–252. doi: 10.1038/nrc2618
106. Kalluri R., Weinberg R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.*, 2009, vol. 119, no. 6, pp. 1420–1428. doi: 10.1172/JCI39104
107. Kalyan S., Kabelitz D. When neutrophils meet T cells: beginnings of a tumultuous relationship with underappreciated potential. *Eur. J. Immunol.*, 2014, vol. 44, no. 3, pp. 627–633. doi: 10.1002/eji.201344195
108. Kamenyeva O., Boularan C., Kabat J., Cheung G.Y., Cicala C., Yeh A.J., Chan J.L., Periasamy S., Otto M., Kehrl J.H. Neutrophil recruitment to lymph nodes limits local humoral response to *Staphylococcus aureus*. *PLoS pathogens*, 2015, vol. 11, no. 4: e1004827. doi: 10.1371/journal.ppat.1004827
109. Kaplan R.N., Riba R.D., Zacharoulis S., Bramley A.H., Vincent L., Costa C., MacDonald D.D., Jin D.K., Shido K., Kerns S.A., Zhu Z., Hicklin D., Wu Y., Port J.L., Altorki N., Port E.R., Ruggiero D., Shmelkov S.V., Jensen K.K., Rafii S., Lyden D. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the premetastatic niche. *Nature*, 2005, vol. 438, no. 7069, pp. 820–827.
110. Kindzelskii A.L., Petty H.R. Early membrane rupture events during neutrophil-mediated antibody-dependent tumor cell cytotoxicity. *J. Immunol.*, 1999, vol. 162, no. 6, pp. 3188–3192.
111. Klemke M., Wabnitz G.H., Funke F., Funk B., Kirchgessner H., Samstag Y. Oxidation of cofilin mediates T cell hyporesponsiveness under oxidative stress conditions. *Immunity*, 2008, vol. 29, no. 3, pp. 404–413. doi: 10.1016/j.immuni.2008.06.016
112. Knaapen A.M., Güngör N., Schins R.P., Borm P.J., Van Schooten F.J. Neutrophils and respiratory tract DNA damage and mutagenesis: a review. *Mutagenesis*, 2006, vol. 21, no. 4, pp. 225–236.
113. Koga Y., Matsuzaki A., Suminoe A., Hattori H., Hara T. Neutrophil-derived related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): a novel mechanism of antitumor effect by neutrophils. *Cancer Res.*, 2004, vol. 64, no. 3, pp. 1037–1043.

114. Kolaczowska E., Jenne C.N., Surewaard B.G., Thanabalasuriar A., Lee W.Y., Sanz M.J., Mowen K., Opendakker G., Kubes P. Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature. *Nat. Commun.*, 2015, vol. 6: 6673. doi: 10.1038/ncomms7673
115. Kowanetz M., Wu X., Lee J., Tan M., Hagenbeek T., Qu X., Yu L., Ross J., Korsisaari N., Cao T., Bou-Reslan H., Kallop D., Weimer R., Ludlam M.J., Kaminker J.S., Modrusan Z., van Bruggen N., Peale F.V., Carano R., Meng Y.G., Ferrara N. Granulocyte-colony stimulating factor promotes lung metastasis through mobilization of Ly6G+Ly6C+ granulocytes. *PNAS*, 2010, vol. 107, no. 50, pp. 21248–21255. doi: 10.1073/pnas.1015855107
116. Kropf P., Baud D., Marshall S.E., Munder M., Mosley A., Fuentes J.M., Bangham C.R., Taylor G.P., Herath S., Choi B.S., Soler G., Teoh T., Modolell M., Müller I. Arginase activity mediates reversible T cell hyporesponsiveness in human pregnancy. *Eur. J. Immunol.*, 2007, vol. 37, iss 4, pp. 935–945.
117. Kruger P., Saffarzadeh M., Weber A.N., Rieber N., Radsak M., von Bernuth H., Benarafa C., Roos D., Skokowa J., Hartl D. Neutrophils: Between Host Defence, Immune Modulation, and Tissue Injury. *PLoS Pathog.*, 2015, vol. 11, no. 3: e1004651. doi: 10.1371/journal.ppat.1004651
118. Kubes P. The enigmatic neutrophil: what we do not know. *Cell Tissue Res.*, 2018, vol. 371, no. 3, pp. 399–406.
119. Lande R., Ganguly D., Facchinetti V., Frasca L., Conrad C., Gregorio J., Meller S., Chamilos G., Sebasigari R., Riccieri V., Bassett R., Amuro H., Fukuhara S., Ito T., Liu Y.J., Gilliet M. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.*, 2011, vol. 3, no. 73, pp. 73ra19. doi: 10.1126/scitranslmed.3001180
120. Lande R., Gregorio J., Facchinetti V., Chatterjee B., Wang Y.H., Homey B., Cao W., Wang Y.H., Su B., Nestle F.O., Zal T., Mellman I., Schröder J.M., Liu Y.J., Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*, 2007, vol. 449, no. 7162, pp. 564–569. <https://www.nature.com/articles/nature06116>
121. Lechner M.G., Liebertz D.J., Epstein A.L. Characterization of cytokine-induced myeloid-derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells. *J. Immunol.*, 2010, vol. 185, no. 4, pp. 2273–2284. doi: 10.4049/jimmunol.1000901
122. Levy B.D., Clish C.B., Schmidt B., Gronert K., Serhan C.N. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat. Immunol.*, 2001, vol. 2, pp. 612–619.
123. Li X., Dai D., Chen B., Tang H., Xie X., Wei W. The value of neutrophil-to-lymphocyte ratio for response and prognostic effect of neoadjuvant chemotherapy in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *J. Cancer*, 2018, vol. 9, no. 5, pp. 861–871. doi: 10.7150/jca.23367
124. Li Y.W., Qiu S.J., Fan J., Zhou J., Gao Q., Xiao Y.S., Xu Y.F. Intratumoral neutrophils: a poor prognostic factor for hepatocellular carcinoma following resection. *J. Hepatol.*, 2011, vol. 54, no. 3, pp. 497–505. doi: 10.1016/j.jhep.2010.07.044
125. Liang F., Lindgren G., Sandgren K.J., Thompson E.A., Francica J.R., Seubert A., De Gregorio E., Barnett S., O'Hagan D.T., Sullivan N.J., Koup R.A., Seder R.A., Loré K. Vaccine priming is restricted to draining lymph nodes and controlled by adjuvant-mediated antigen uptake. *Sci. Transl. Med.*, 2017, vol. 9, no. 393: eaal2094. doi: 10.1126/scitranslmed.aal2094
126. Liang W., Ferrara N. The complex role of neutrophils in tumor angiogenesis and metastasis. *Cancer Immunol. Res.*, 2016, vol. 4, no. 2, pp. 83–91. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0313
127. Lichtenstein A., Seelig M., Berek J., Zigelboim J. Human neutrophil-mediated lysis of ovarian cancer cells. *Blood*, 1989, vol. 74, no. 2, pp. 805–809.
128. Lin A., Loré K. Granulocytes: new members of the antigen-presenting cell family. *Front. Immunol.*, 2017, vol. 8: 1781. doi: 10.3389/fimmu.2017.01781
129. Liu C., Li Y., Yu J., Feng L., Hou S., Liu Y., Guo M., Xie Y., Meng J., Zhang H., Xiao B., Ma C. Targeting the shift from M1 to M2 macrophages in experimental autoimmune encephalomyelitis mice treated with fasudil. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 2: e54841. doi: 10.1371/journal.pone.0054841
130. Liu Y.J. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu. Rev. Immunol.*, 2005, vol. 23, pp. 275–306.
131. Lopez-Lago M.A., Posner S., Thodima V.J., Molina A.M., Motzer R.J., Chaganti R.S. Neutrophil chemokines secreted by tumor cells mount a lung antimetastatic response during renal cell carcinoma progression. *Oncogene*, 2013, vol. 32, no. 14, pp. 1752–1760. doi: 10.1038/onc.2012.201
132. Loynes C.A., Lee J.A., Robertson A.L., Steel M.J.G., Ellett F., Feng Y., Levy B.D., Whyte M.K., Renshaw S.A. PGE2 production at sites of tissue injury promotes an anti-inflammatory neutrophil phenotype and determines the outcome of inflammation resolution in vivo. *BioRxiv*, 2017.
133. Luckner-Minden C., Fischer I., Langhans C.D., Schiller M., Kropf P., Muller I., Hohlfeld J.M., Ho A.D., Munder M. Human eosinophil granulocytes do not express the enzyme arginase. *J. Leukoc. Biol.*, 2010, vol. 87, no. 6, pp. 1125–1132. doi: 10.1189/jlb.1109741
134. Mader J.S., Ewen C., Hancock R.E., Bleackley R.C. The human cathelicidin, LL-37, induces granzyme-mediated apoptosis in regulatory T cells. *J. Immunother.*, 2011, vol. 34, no. 3, pp. 229–235. doi: 10.1097/CJI.0b013e318207ecdf
135. Mader J.S., Marcet-Palacios M., Hancock R.E., Bleackley R.C. The human cathelicidin, LL-37, induces granzyme-mediated apoptosis in cytotoxic T lymphocytes. *Exp. Cell Res.*, 2011, vol. 317, no. 4, pp. 531–538. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.11.015
136. Maffia P.C., Zittermann S.E., Scimone M.L., Tateosian N., Amiano N., Guerrieri D., Lutzky V., Rosso D., Romeo H.E., Garcia V.E., Issekutz A.C., Chuluyan H.E. Neutrophil elastase converts human immature dendritic cells into transforming growth factor- β 1-secreting cells and reduces allostimulatory ability. *Am. J. Pathol.*, 2007, vol. 171, no. 3, pp. 928–937.
137. Malcolm K.C., Arndt P.G., Manos E.J., Jones D.A., Worthen G.S. Microarray analysis of lipopolysaccharide-treated human neutrophils. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2003, vol. 284, no. 4, pp. L663–L670.
138. Maletto B.A., Ropolo A.S., Alignani D.O., Liscovsky M.V., Ranocchia R.P., Moron V.G., Pistoiresi-Palencia M.C. Presence of neutrophil-bearing antigen in lymphoid organs of immune mice. *Blood*, 2006, vol. 108, no. 9, pp. 3094–3102.

139. Malmberg K.J., Arulampalam V., Ichihara F., Petersson M., Seki K., Andersson T., Lenkei R., Masucci G., Pettersson S., Kiessling R. Inhibition of activated/memory (CD45RO(+)) T cells by oxidative stress associated with block of NF-kappaB activation. *J. Immunol.*, 2001, vol. 167, no. 5, pp. 2595–2601.
140. Mandruzzato S., Brandau S., Britten C.M., Bronte V., Damuzzo V., Gouttefangeas C., Maurer D., Ottensmeier C., van der Burg S.H., Welters M.J., Walter S. Toward harmonized phenotyping of human myeloid-derived suppressor cells by flow cytometry: results from an interim study. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2016, vol. 65, no. 2, pp. 161–169. doi: 10.1007/s00262-015-1782-5
141. Mantovani A., Cassatella M.A., Costantini C., Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, vol. 11, no. 8, pp. 519–531. doi: 10.1038/nri3024
142. Martinez F.O., Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *FI000Prime Rep.*, 2014, vol. 6: 13. doi: 10.12703/P6-13
143. Masedunskas A., Milberg O., Porat-Shliom N., Sramkova M., Wigand T., Amornphimoltham P., Weigert R. Intravital microscopy: a practical guide on imaging intracellular structures in live animals. *BioArchitecture*, 2012, vol. 2, no. 5, pp. 143–157. doi: 10.4161/bioa.21758
144. Mathias J.R., Perrin B.J., Liu T.X., Kanki J., Look A.T., Huttenlocher A. Resolution of inflammation by retrograde chemotaxis of neutrophils in transgenic zebrafish. *J. Leukoc. Biol.*, 2006, vol. 80, no. 6, pp. 1281–1288.
145. Matsushima H., Geng S., Lu R., Okamoto T., Yao Y., Mayuzumi N., Kotol P.F., Chojnacki B.J., Miyazaki T., Gallo R.L., Takashima A. Neutrophil differentiation into a unique hybrid population exhibiting dual phenotype and functionality of neutrophils and dendritic cells. *Blood*, 2013, vol. 121, no. 10, pp. 1677–1689. doi: 10.1182/blood-2012-07-445189
146. McDonald B., Pittman K., Menezes G.B., Hirota S.A., Slaba I., Waterhouse C.C., Beck P.L., Muruve D.A., Kubers P. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science*, 2010, vol. 330, no. 6002, pp. 362–366. doi: 10.1126/science.1195491
147. McNulty S., Fonfria E. The role of TRPM channels in cell death. *Pflügers Arch.*, 2005, vol. 451, no. 1, pp. 235–242. doi: 10.1007/s00424-005-1440-4
148. Means T.K., Latz E., Hayashi F., Murali M.R., Golenbock D.T., Luster A.D. Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J. Clin. Invest.*, 2005, vol. 115, no. 2, pp. 407–417.
149. Merad M., Manz M.G. Dendritic cell homeostasis. *Blood*, 2009, vol. 113, no. 15, pp. 3418–3427. doi: 10.1182/blood-2008-12-180646
150. Mishalian I., Bayuh R., Eruslanov E., Michaeli J., Levy L., Zolotarov L., Singhal S., Albelda S.M., Granot Z., Fridlender Z.G. Neutrophils recruit regulatory T-cells into tumors via secretion of CCL17 – a new mechanism of impaired antitumor immunity. *Int. J. Cancer*, 2014, vol. 135, no. 5, pp. 1178–1186. doi: 10.1002/ijc.28770
151. Mougiakakos D., Johansson C.C., Kiessling R. Naturally occurring regulatory T cells show reduced sensitivity toward oxidative stress-induced cell death. *Blood*, 2009, vol. 113, no. 15, pp. 3542–3545. doi: 10.1182/blood-2008-09-181040
152. Munder M., Mollinedo F., Calafat J., Canchado J., Gil-Lamaignere C., Fuentes J.M., Luckner C., Doschko G., Soler G., Eichmann K., Muller F.M., Ho A.D., Goerner M., Modolell M. Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. *Blood*, 2005, vol. 105, no. 6, pp. 2549–2556.
153. Munder M., Schneider H., Luckner C., Giese T., Langhans C.D., Fuentes J.M., Kropf P., Mueller I., Kolb A., Modolell M., Ho A.D. Suppression of T-cell functions by human granulocyte arginase. *Blood*, 2006, vol. 108, no. 5, pp. 1627–1634.
154. Nakazawa D., Shida H., Kusunoki Y., Miyoshi A., Nishio S., Tomaru U., Atsumi T., Ishizu A. The responses of macrophages in interaction with neutrophils that undergo NETosis. *J. Autoimmun.*, 2016, vol. 67, pp. 19–28. doi: 10.1016/j.jaut.2015.08.018
155. Nicolás-Ávila J.Á., Adrover J.M., Hidalgo A. Neutrophils in homeostasis, immunity, and cancer. *Immunity*, 2017, vol. 46, no. 1, pp. 15–28. doi: 10.1016/j.immuni.2016.12.012
156. Ocana A., Nieto-Jiménez C., Pandiella A., Templeton A.J. Neutrophils in cancer: prognostic role and therapeutic strategies. *Mol. Cancer.*, 2017, vol. 16, no. 1: 137. doi: 10.1186/s12943-017-0707-7
157. Odobasic D., Kitching A.R., Yang Y., O'Sullivan K.M., Muljadi R.C., Edgton K.L., Tan D.S., Summers S.A., Morand E.F., Holdsworth S.R. Neutrophil myeloperoxidase regulates T-cell-driven tissue inflammation in mice by inhibiting dendritic cell function. *Blood*, 2013, vol. 121, no. 20, pp. 4195–4204. doi: 10.1182/blood-2012-09-456483
158. Ostrand-Rosenberg S., Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J. Immunol.*, 2009, vol. 182, no. 8, pp. 4499–4506. doi: 10.4049/jimmunol.0802740
159. Ouyang W., Kolls J.K., Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity*, 2008, vol. 28, no. 4, pp. 454–467. doi: 10.1016/j.immuni.2008.03.004
160. Pählman L.I., Mörgelin M., Eckert J., Johansson L., Russell W., Riesbeck K., Soehnlein O., Lindbom L., Norrby-Teglund A., Schumann R.R., Björck L., Herwald H. Streptococcal M-protein: a multipotent and powerful inducer of inflammation. *J. Immunol.*, 2006, vol. 177, no. 2, pp. 1221–1228.
161. Park S.A., Hyun Y.M. Neutrophil extravasation cascade: what can we learn from two-photon intravital imaging? *Immune Netw.*, 2016, vol. 16, no. 6, pp. 317–321. doi: 10.4110/in.2016.16.6.317
162. Pelletier M., Maggi L., Micheletti A., Lazzeri E., Tamassia N., Costantini C., Cosmi L., Lunardi C., Annunziato F., Romagnani S., Cassatella M.A. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood*, 2010, vol. 115, no. 2, pp. 335–343. doi: 10.1182/blood-2009-04-216085
163. Perobelli S.M., Silva T.G., Bonomo A. Neutrophils plasticity: the regulatory interface in various pathological conditions. In: Role of neutrophils in disease pathogenesis. Ed. Maitham Khajah. Chapter 7. Published by InTechOpen, 2017, 178 p.
164. Perobelli S.M., Galvani R.G., Gonçalves-Silva T., Xavier C.R., Nóbrega A., Bonomo A. Plasticity of neutrophils reveals modulatory capacity. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2015, vol. 48, no. 8, pp. 665–675. doi: 10.1590/1414-431X20154524
165. Piccard H., Muschel R.J., Opendakker G. On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2012, vol. 82, no. 3, pp. 296–309. doi: 10.1016/j.critrevonc.2011.06.004
166. Pillay J., Kamp V.M., van Hoffen E., Visser T., Tak T., Lammers J.W., Ulfman L.H., Leenen L.P., Pickkers P., Koenderman L. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J. Clin. Invest.*, 2012, vol. 122, no. 1, pp. 327–336. doi: 10.1172/JCI57990

167. Pillay J., Tak T., Kamp V.M., Koenderman L. Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2013, vol. 70, no. 20, pp. 3813–3827. doi: 10.1007/s00018-013-1286-4
168. Pittman K., Kubes P. Damage-associated molecular patterns control neutrophil recruitment. *J. Innate. Immun.*, 2013, vol. 5, no. 4, pp. 315–323. doi: 10.1159/000347132
169. Poon I.K., Lucas C.D., Rossi A.G., Ravichandran K.S. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nat. Rev. Immunol.*, 2014, vol. 14, no. 3, pp. 166–180. doi: 10.1038/nri3607
170. Powell D.R., Huttenlocher A. Neutrophils in the tumor microenvironment. *Trends Immunol.*, 2016, vol. 37, no. 1, pp. 41–52. doi: 10.1016/j.it.2015.11.008
171. Prame Kumar K., Nicholls A.J., Wong C.H.Y. Partners in crime: neutrophils and monocytes/macrophages in inflammation and disease. *Cell Tissue Res.*, 2018, vol. 371, no. 3, pp. 551–565. doi: 10.1007/s00441-017-2753-2
172. Psaila B., Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat. Rev. Cancer*, 2009, vol. 9, no. 4, pp. 285–293. doi: 10.1038/nrc2621
173. Puga I., Cols M., Barra C.M., He B., Cassis L., Gentile M., Comerma L., Chorny A., Shan M., Xu W., Magri G., Knowles D.M., Tam W., Chiu A., Bussel J.B., Serrano S., Lorente J.A., Bellosillo B., Lloreta J., Juanpere N., Alameda F., Baró T., de Heredia C.D., Torán N., Català A., Torreadell M., Fortuny C., Cusi V., Carreras C., Diaz G.A., Blander J.M., Farber C.M., Silvestri G., Cunningham-Rundles C., Calvillo M., Dufour C., Notarangelo L.D., Lougaris V., Plebani A., Casanova J.L., Ganal S.C., Diefenbach A., Aróstegui J.I., Juan M., Yagüe J., Mahlaoui N., Donadieu J., Chen K., Cerutti A. B cell-helper neutrophils stimulate immunoglobulin diversification and production in the marginal zone of the spleen. *Nat. Immunol.*, 2011, vol. 13, no. 2, pp. 170–180. doi: 10.1038/ni.2194
174. Queen M.M., Ryan R.E., Holzer R.G., Keller-Peck C.R., Jorcyk C.L. Breast cancer cells stimulate neutrophils to produce oncostatin M: potential implications for tumor progression. *Cancer Res.*, 2005, vol. 65, no. 19, pp. 8896–8904.
175. Radsak M., Iking-Konert C., Stegmaier S., Andrassy K., Hänsch G.M. Polymorphonuclear neutrophils as accessory cells for T-cell activation: major histocompatibility complex class II restricted antigen-dependent induction of T-cell proliferation. *Immunology*, 2000, vol. 101, no. 4, pp. 521–530.
176. Rafii S., Lyden D. S100 chemokines mediate bookmarking of premetastatic niches. *Nat. Cell Biol.*, 2006, vol. 8, no. 12, pp. 1321–1323.
177. Rahman A.H., Taylor D.K., Turka L.A. The contribution of direct TLR signaling to T cell responses. *Immunol. Res.*, 2009, vol. 45, no. 1, pp. 25–36. doi: 10.1007/s12026-009-8113-x
178. Randolph G.J., Ochando J., Prida-Sanchez S. Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annu. Rev. Immunol.*, 2008, vol. 26, pp. 293–316.
179. Rao H.L., Chen J.W., Li M., Xiao Y.B., Fu J., Zeng Y.X., Cai M.Y., Xie D. Increased intratumoral neutrophil in colorectal carcinomas correlates closely with malignant phenotype and predicts patients' adverse prognosis. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 1: e30806. doi: 10.1371/journal.pone.0030806
180. Ribeiro-Gomes F.L., Peters N.C., Debrabant A., Sacks D.L. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. *PLoS Pathog.*, 2012, vol. 8, no. 2: e1002536. doi: 10.1371/journal.ppat.1002536
181. Ribeiro-Gomes F.L., Romano A., Lee S., Roffé E., Peters N.C., Debrabant A., Sacks D. Apoptotic cell clearance of Leishmania major-infected neutrophils by dendritic cells inhibits CD8+ T-cell priming in vitro by Mer tyrosine kinase-dependent signaling. *Cell Death Dis.*, 2015, vol. 6: e2018. doi: 10.1038/cddis.2015.351
182. Rodriguez F.M., Novak I.T.C. Costimulatory molecules CD80 and CD86 colocalized in neutrophil extracellular traps (NETs). *J. Immunol. Inf. Dis.*, 2016, vol. 3, no. 1: 103.
183. Rodriguez P.C., Quiceno D.G., Ochoa A.C. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood*, 2007, vol. 109, no. 4, pp. 1568–1573.
184. Rodriguez P.C., Zea A.H., Culotta K.S., Zabaleta J., Ochoa J.B., Ochoa A.C. Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, no. 24, pp. 21123–21129.
185. Rosales C. Neutrophil: a cell with many roles in inflammation or several cell types? *Front. Physiol.*, 2018, vol. 9: 113. doi: 10.3389/fphys.2018.00113
186. Rotondo R., Bertolotto M., Barisione G., Astigiano S., Mandruzzato S., Ottonello L., Dallegrì F., Bronte V., Ferrini S., Barbieri O. Exocytosis of azurophil and arginase 1-containing granules by activated polymorphonuclear neutrophils is required to inhibit T lymphocyte proliferation. *J. Leukoc. Biol.*, 2011, vol. 89, no. 5, pp. 721–727. doi: 10.1189/jlb.1109737
187. Sagiv J.Y., Michaeli J., Assi S., Mishalian I., Kisos H., Levy L., Damti P., Lumbroso D., Polyansky L., Sionov R.V., Ariel A., Hovav A.H., Henke E., Fridlender Z.G., Granot Z. Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. *Cell Rep.*, 2015, vol. 10, no. 4, pp. 562–573. doi: 10.1016/j.celrep.2014.12.039
188. Sandilands G.P., Ahmed Z., Perry N., Davison M., Lupton A., Young B. Cross-linking of neutrophil CD11b results in rapid cell surface expression of molecules required for antigen presentation and T-cell activation. *Immunology*, 2005, vol. 114, no. 3, pp. 354–368.
189. Sandilands G.P., McCrae J., Hill K., Perry M., Baxter D. Major histocompatibility complex class II (DR) antigen and costimulatory molecules on in vitro and in vivo activated human polymorphonuclear neutrophils. *Immunology*, 2006, vol. 119, no. 4, pp. 562–571.
190. Sato T., Takahashi S., Mizumoto T., Harao M., Akizuki M., Takasugi M., Fukutomi T., Yamashita J. Neutrophil elastase and cancer. *Surg. Oncol.*, 2006, vol. 15, no. 4, pp. 217–222.
191. Scannell M., Flanagan M.B., deStefani A., Wynne K.J., Cagney G., Godson C., Maderna P. Annexin-1 and peptide derivatives are released by apoptotic cells and stimulate phagocytosis of apoptotic neutrophils by macrophages. *J. Immunol.*, 2007, vol. 178, no. 7, pp. 4595–4605.
192. Scapini P., Cassatella M.A. Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood*, 2014, vol. 124, no. 5, pp. 710–719. doi: 10.1182/blood-2014-03-453217

193. Schmielau J., Finn O.J. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of T-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res.*, 2001, vol. 61, no. 12, pp. 4756–4760.
194. Schuster S., Hurrell B., Tacchini-Cottier F. Crosstalk between neutrophils and dendritic cells: a context-dependent process. *J. Leukoc. Biol.*, 2013, vol. 94, no. 4, pp. 671–675. doi: 10.1189/jlb.1012540
195. Schwab J.M., Chiang N., Arita M., Serhan C.N. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation resolution programmes. *Nature*, 2007, vol. 447, no. 7146, pp. 869–874.
196. Secklehner J., Lo Celso C., Carlin L.M. Intravital microscopy in historic and contemporary immunology. *Immunol. Cell Biol.*, 2017, vol. 95, no. 6, pp. 506–513. doi: 10.1038/icb.2017.25
197. Serafini P., Borrello I., Bronte V. Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Semin. Cancer Biol.*, 2006, vol. 16, no. 1, pp. 53–65.
198. Serhan C.N., Chiang N., Van Dyke T.E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, vol. 8, no. 5, pp. 349–361. doi: 10.1038/nri2294
199. Serhan C.N., Clish C.B., Brannon J., Colgan S.P., Chiang N., Gronert K. Novel functional sets of lipid derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J. Exp. Med.*, 2000, vol. 192, no. 8, pp. 1197–1204.
200. Sharpe A.H., Freeman G.J. The B7-CD28 superfamily. *Nat. Rev. Immunol.*, 2002, vol. 2, no. 2, pp. 116–126.
201. Shaul M.E., Fridlender Z.G. Cancer related circulating and tumor-associated neutrophils — subtypes, sources and function. *FEBS J.*, 2018.
202. Silva M.T. Macrophage phagocytosis of neutrophils at inflammatory/infectious foci: a cooperative mechanism in the control of infection and infectious inflammation. *J. Leukoc. Biol.*, 2011, vol. 89, no. 5, pp. 675–683. doi: 10.1189/jlb.0910536
203. Silvestre-Roig C., Hidalgo A., Soehnlein O. Neutrophil heterogeneity: implications for homeostasis and pathogenesis. *Blood*, 2016, vol. 127, no. 18, pp. 2173–81. doi: 10.1182/blood-2016-01-688887
204. Singhal S., Bhojnarwala P.S., O'Brien S., Moon E.K., Garfall A.L., Rao A.S., Quatromoni J.G., Stephen T.L., Litzky L., Deshpande C., Feldman M.D., Hancock W.W., Conejo-Garcia J.R., Albelda S.M., Eruslanov E.B. Origin and role of a subset of tumor-associated neutrophils with antigen-presenting cell features in early-stage human lung cancer. *Cancer Cell*, 2016, vol. 30, no. 1, pp. 120–135. doi: 10.1016/j.ccell.2016.06.001
205. Skrzeczynska-Moncznik J., Wlodarczyk A., Banas M., Kwitniewski M., Zabieglo K., Kapinska-Mrowiecka M., Dubin A., Cichy J. DNA structures decorated with cathepsin G/secretory leukocyte proteinase inhibitor stimulate IFN γ production by plasmacytoid dendritic cells. *Am. J. Clin. Exp. Immunol.*, 2013, vol. 2, no. 2, pp. 186–194.
206. Smith D.A., Kiba A., Zong Y., Witte O.N. Interleukin-6 and oncostatin-M synergize with the PI3K/AKT pathway to promote aggressive prostate malignancy in mouse and human tissues. *Mol. Cancer Res.*, 2013, vol. 11, no. 10, pp. 1159–1165. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0238
207. Soehnlein O., Kai-Larsen Y., Frithiof R., Sorensen O.E., Kenne E., Scharffetter-Kochanek K., Eriksson E.E., Herwald H., Agerberth B., Lindbom L. Neutrophil primary granule proteins HBP and HNP1–3 boost bacterial phagocytosis by human and murine macrophages. *J. Clin. Invest.*, 2008, vol. 118, no. 10, pp. 3491–3502. doi: 10.1172/JCI35740
208. Soehnlein O., Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2010, vol. 10, no. 6, pp. 427–439. doi: 10.1038/nri2779
209. Solito E., Kamal A., Russo-Marie F., Buckingham J.C., Marullo S., Perretti M. A novel calcium-dependent proapoptotic effect of annexin 1 on human neutrophils. *FASEB J.*, 2003, vol. 17, no. 11, pp. 1544–1546.
210. Solito S., Falisi E., Diaz-Montero C.M., Doni A., Pinton L., Rosato A., Francescato S., Basso G., Zanovello P., Onicescu G., Garrett-Mayer E., Montero A.J., Bronte V., Mandruzzato S. A human promyelocytic-like population is responsible for the immune suppression mediated by myeloid-derived suppressor cells. *Blood*, 2011, vol. 118, no. 8, pp. 2254–2265. doi: 10.1182/blood-2010-12-325753
211. Solito S., Marigo I., Pinton L., Damuzzo V., Mandruzzato S., Bronte V. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity in human cancers. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2014, vol. 1319, no. 1, pp. 47–65. doi: 10.1111/nyas.12469
212. Spiegel A., Brooks M.W., Houshyar S., Reinhardt F., Ardolino M., Fessler E., Chen M.B., Krall J.A., DeCock J., Zervantonakis I.K., Iannello A., Iwamoto Y., Cortez-Retamozo V., Kamm R.D., Pittet M.J., Raulat D.H., Weinberg R.A. Neutrophils suppress intraluminal NK cell-mediated tumor cell clearance and enhance extravasation of disseminated carcinoma cells. *Cancer Discov.*, 2016, vol. 6, no. 6, pp. 630–649. doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-1157
213. Stagg A.J., Hart A.L., Knight C.S., Kamm M.A. The dendritic cell: its role in intestinal inflammation and relationship with gut bacteria. *Gut*, 2003, vol. 52, pp. 1522–1529.
214. Stark M.A., Huo Y., Burcin T.L., Morris M.A., Olson T.S., Ley K. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity*, 2005, vol. 22, no. 3, pp. 285–294.
215. Stein M., Keshav S., Harris N., Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J. Exp. Med.*, 1992, vol. 176, no. 1, pp. 287–292.
216. Steinman, R.M. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu. Rev. Immunol.*, 2012, vol. 30, pp. 1–22. doi: 10.1146/annurev-immunol-100311-102839
217. Takano T., Azuma N., Satoh M., Toda A., Hashida Y., Satoh R., Hohdatsu T. Neutrophil survival factors (TNF- α , GM-CSF, and G-CSF) produced by macrophages in cats infected with feline infectious peritonitis virus contribute to the pathogenesis of granulomatous lesions. *Arch. Virol.*, 2009, vol. 154, no. 5, pp. 775–781. doi: 10.1007/s00705-009-0371-3
218. Tateosian N.L., Reiteri R.M., Amiano N.O., Costa M.J., Villalonga X., Guerrieri D., Maffia P.C. Neutrophil elastase treated dendritic cells promote the generation of CD4(+)FOXP3(+) regulatory T cells in vitro. *Cell. Immunol.*, 2011, vol. 269, no. 2, pp. 128–134. doi: 10.1016/j.cellimm.2011.03.013
219. Templeton A.J., McNamara M.G., Šeruga B., Vera-Badillo F.E., Aneja P., Ocaña A., Leibowitz-Amit R., Sonpavde G., Knox J.J., Tran B., Tannock I.F., Amir E. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2014, vol. 106, no. 6: dju124. doi: 10.1093/jnci/dju124

220. Tesmer L.A., Lundy S.K., Sarkar S., Fox D.A. Th17 cells in human disease. *Immunol. Rev.*, 2008, vol. 223, no. 1, pp. 87–113. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00628.x
221. Tillack K., Breiden P., Martin R., Sospedra M. T lymphocyte priming by neutrophil extracellular traps links innate and adaptive immune responses. *J. Immunol.*, 2012, vol. 188, no. 7, pp. 3150–3159. doi: 10.4049/jimmunol.1103414
222. Tohme S., Yazdani H.O., Al-Khafaji A.B., Chidi A.P., Loughran P., Mowen K., Wang Y., Simmons R.L., Huang H., Tsung A. Neutrophil extracellular traps promote the development and progression of liver metastases after surgical stress. *Cancer Res.*, 2016, vol. 76, no. 6, pp. 1367–1380. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1591
223. Trellakis S., Bruderek K., Dumitru C.A., Gholaman H., Gu X., Bankfalvi A., Scherag A., Hütte J., Dominas N., Lehnerdt G.F., Hoffmann T.K., Lang S., Brandau S. Polymorphonuclear granulocytes in human head and neck cancer: enhanced inflammatory activity, modulation by cancer cells and expansion in advanced disease. *Int. J. Cancer*, 2011, vol. 129, no. 9, pp. 2183–2193. doi: 10.1002/ijc.25892
224. Trellakis S., Farjah H., Bruderek K., Dumitru C.A., Hoffmann T.K., Lang S., Brandau S. Peripheral blood neutrophil granulocytes from patients with head and neck squamous cell carcinoma functionally differ from their counterparts in healthy donors. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 2011, vol. 24, no. 3, pp. 683–693.
225. Valladeau J., Saeland S. Cutaneous dendritic cells. *Semin. Immunol.*, 2005, vol. 17, no. 4, pp. 273–283.
226. Van Dyken S.J., Locksley R.M. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease. *Annu. Rev. Immunol.*, 2013, vol. 31, pp. 317–343. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095906
227. Van Gisbergen K.P., Sanchez-Hernandez M., Geijtenbeek T.B., van Kooyk Y. Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J. Exp. Med.*, 2005, vol. 201, no. 8, pp. 1281–1292.
228. Veglia F., Perego M., Gabrilovich D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat. Immunol.*, 2018, vol. 19, no. 2, pp. 108–119. doi: 10.1038/s41590-017-0022-x
229. Vono M., Lin A., Norrby-Teglund A., Koup R.A., Liang F., Loré K. Neutrophils acquire the capacity for antigen presentation to memory CD4+ T cells in vitro and ex vivo. *Blood*, 2017, vol. 129, no. 14, pp. 1991–2001. doi: 10.1182/blood-2016-10-744441
230. Walter S., Weinschenk T., Stenzl A., Zdrojowy R., Pluzanska A., Szczylik C., Staehler M., Brugger W., Dietrich P.Y., Mendrzyk R., Hilf N., Schoor O., Fritsche J., Mahr A., Maurer D., Vass V., Trautwein C., Lewandrowski P., Flohr C., Pohla H., Stanczak J.J., Bronte V., Mandruzzato S., Biedermann T., Pawelec G., Derhovanessian E., Yamagishi H., Miki T., Hongo F., Takaha N., Hirakawa K., Tanaka H., Stevanovic S., Frisch J., Mayer-Mokler A., Kirner A., Rammensee H.G., Reinhardt C., Singh-Jasuja H. Multi-peptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nat. Med.*, 2012, vol. 18, no. 8, pp. 1254–1261. doi: 10.1038/nm.2883
231. Wang J. Neutrophils in tissue injury and repair. *Cell Tissue Res.*, 2018, vol. 371, no. 3, pp. 531–539.
232. Wang J.F., Li J.B., Zhao Y.J., Yi W.J., Bian J.J., Wan X.J., Zhu K.M., Deng X.M. Up-regulation of programmed cell death 1 ligand 1 on neutrophils may be involved in sepsis-induced immunosuppression: an animal study and a prospective case-control study. *Anesthesiology*, 2015, vol. 122, no. 4, pp. 852–863. doi: 10.1097/ALN.0000000000000525
233. Wang L., Chang E.W., Wong S.C., Ong S.M., Chong D.Q., Ling K.L. Increased myeloid-derived suppressor cells in gastric cancer correlate with cancer stage and plasma S100A8/A9 proinflammatory proteins. *J. Immunol.*, 2013, vol. 190, no. 2, pp. 794–804. doi: 10.4049/jimmunol.1202088
234. Wang T.T., Zhao Y.L., Peng L.S., Chen N., Chen W., Lv Y.P., Mao F.Y., Zhang J.Y., Cheng P., Teng Y.S., Fu X.L., Yu P.W., Guo G., Luo P., Zhuang Y., Zou Q.M. Tumour-activated neutrophils in gastric cancer foster immune suppression and disease progression through GM-CSF-PD-L1 pathway. *Gut*, 2017, vol. 66, no. 11, pp. 1900–1911. doi: 10.1136/gutjnl-2016-313075
235. Webb N.J., Myers C.R., Watson C.J., Bottomley M.J., Brenchley P.E. Activated human neutrophils express vascular endothelial growth factor (VEGF). *Cytokine*, 1998, vol. 10, no. 4, pp. 254–257.
236. Wels J., Kaplan R.N., Rafii S., Lyden D. Migratory neighbors and distant invaders: tumor-associated niche cells. *Genes Dev.*, 2008, vol. 22, no. 5, pp. 559–574. doi: 10.1101/gad.1636908
237. Wislez M., Fleury-Feith J., Rabbe N., Moreau J., Cesari D., Milleron B., Mayaud C., Antoine M., Soler P., Cadranel J. Tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor prolong the survival of neutrophils infiltrating bronchoalveolar subtype pulmonary adenocarcinoma. *Am. J. Pathol.*, 2001, vol. 159, no. 4, pp. 1423–1433.
238. Wittamer V., Bondue B., Guillaubert A., Vassart G., Parmentier M., Communi D. Neutrophil-mediated maturation of chemerin: a link between innate and adaptive immunity. *J. Immunol.*, 2005, vol. 175, no. 1, pp. 487–493.
239. Woodfin A., Voisin M.B., Beyrau M., Colom B., Caille D., Diapouli F.M., Nash G.B., Chavakis T., Albelda S.M., Rainger G.E., Meda P., Imhof B.A., Nourshargh S. The junctional adhesion molecule (JAM-C) regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo. *Nat. Immunol.*, 2011, vol. 12, no. 8, pp. 761–769. doi: 10.1038/ni.2062
240. Wu D., Zeng Y., Fan Y., Wu J., Mulatibieke T., Ni J., Yu G., Wan R., Wang X., Hu G. Reverse-migrated neutrophils regulated by JAM-C are involved in acute pancreatitis-associated lung injury. *Sci. Rep.*, 2016, vol. 6, article number: 20545. doi: 10.1038/srep20545
241. Wynn T.A., Vannella K.M. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. *Immunity*, 2016, vol. 44, no. 3, pp. 450–462. doi: 10.1016/j.immuni.2016.02.015
242. Xu N., Lei X., Liu L. Tracking neutrophil intraluminal crawling, transendothelial migration and chemotaxis in tissue by intravital video microscopy. *J. Vis. Exp.*, 2011, vol. 55: e3296. doi: 10.3791/3296
243. Yang C.W., Strong B.S., Miller M.J., Unanue E.R. Neutrophils influence the level of antigen presentation during the immune response to protein antigens in adjuvants. *J. Immunol.*, 2010, vol. 185, no. 5, pp. 2927–2934. doi: 10.4049/jimmunol.1001289
244. Youn J.I., Kumar V., Collazo M., Nefedova Y., Condamine T., Cheng P., Villagra A., Antonia S., McCaffrey J.C., Fishman M., Sarnaik A., Horna P., Sotomayor E., Gabrilovich D.I. Epigenetic silencing of retinoblastoma gene regulates pathologic differentiation of myeloid cells in cancer. *Nat. Immunol.*, 2013, vol. 14, no. 3, pp. 211–220. doi: 10.1038/ni.2526

245. Youn J.I., Nagaraj S., Collazo M., Gabrilovich D.I. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J. Immunol.*, 2008, vol. 181, no. 8, pp. 5791–5802.
246. Zivkovic M., Poljak-Blazi M., Egger G., Sunjic S.B., Schaur R.J., Zarkovic N. Oxidative burst and anticancer activities of rat neutrophils. *BioFactors*, 2005, vol. 24, no. 1–4, pp. 305–312.
247. Zivkovic M., Poljak-Blazi M., Zarkovic K., Mihaljevic D., Schaur R.J., Zarkovic N. Oxidative burst of neutrophils against melanoma B16-F10. *Cancer Lett.*, 2007, vol. 246, no. 1–2, pp. 100–108.

Авторы:

Долгушин И.И., д.м.н., профессор, Президент ФГБОУ Южно-Уральский государственный медицинский университет (ФГБОУ ВО ЮУГМУ) Минздрава России, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики, г. Челябинск, Россия;

Мезенцева Е.А., к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, г. Челябинск, Россия;

Савочкина А.Ю., д.м.н., доцент, профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, г. Челябинск, Россия;

Кузнецова Е.К., к.м.н., ассистент кафедры кожных и венерических болезней ФГБОУ ВО Оренбургский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Оренбург, Россия.

Authors:

Dolgushin I.I., PhD, MD (Medicine), Professor, President of South-Ural State Medical University, Head of the Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics, South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation;

Mezentseva E.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics, South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation;

Savochkina A.Yu., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor of the Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics, South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation;

Kuznetsova E.K., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Skin and Sexually Transmitted Diseases, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 03.07.2018
Отправлена на доработку 04.03.2019
Принята к печати 22.03.2019

Received 03.07.2018
Revision received 04.03.2019
Accepted 22.03.2019

ТРЕФОИЛОВЫЕ ФАКТОРЫ — НОВЫЕ МАРКЕРЫ МУКОЗАЛЬНОГО БАРЬЕРА ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

А.В. Шестопалов^{1,2,3}, А.С. Дворников¹, О.В. Борисенко¹, А.В. Тутельян^{2,4}

¹ ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова
Минздрава России, Москва, Россия

² ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии
имени Дмитрия Рогачева Минздрава России, Москва, Россия

³ ФГБУ Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью
Минздрава России, Москва, Россия

⁴ ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Резюме. Трефоиловые факторы представляют собой пептиды, содержащие структурный домен в виде листа клевера. Они синтезируются во многих органах: в различных отделах человеческого мозга (предполагается участие трефоиловых факторов в развитии и дифференциации нервной системы), в щитовидной железе, молочной железе, матке, предстательной железе, в конъюнктиве, в дыхательной системе, в слюнных железах, желчном пузыре, но в наибольшем количестве обнаруживаются на слизистой желудочно-кишечного тракта: TFF-1 — в желудке, TFF-2 — в желудке и в двенадцатиперстной кишке, TFF-3 — в кишечнике. Все большее число исследований говорит не только о широкой распространенности трефоиловых пептидов в организме, но также и об их важных регуляторных функциях. Трефоиловые факторы влияют на клеточную адгезию, усиливая способность к миграции эпителиальных клеток. Восстановление обратимо поврежденных структур эпителия — реституция — облегчается также за счет антиапоптотического действия трефоиловых пептидов (аноикс-резистентность). Проангиогенные свойства трефоиловых пептидов значительно выражены и могут способствовать ангиогенезу опухолей. Иммуномодулирующие свойства трефоиловых факторов заключаются во влиянии на экспрессию провоспалительных и защитных факторов (в том числе оксида азота, цитокинов, дефензинов). Взаимодействие трефоиловых факторов и муцина повышает вязкость слизи, что играет роль в защите слизистой оболочки против ulcerогенных агентов. В то же время повышение вязкости слизи в присутствии TFF-2 может быть фактором, ухудшающим течение бронхиальной астмы. Уровень экспрессии трефоиловых факторов связан с патогенезом воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта. Показано, что направленность изменений в уровне трефоиловых факторов может отличаться в зависимости от локализации и глубины поражения. Изменение экспрессии трефоиловых факторов играет важную роль в онкогенезе. Рак желудка и колоректальный рак сопровождается повышением экспрессии TFF-1. Содержание трефоиловых факторов связано со стадией развития опухоли, и привлекает внимание исследователей как диагностический показатель, характеризующий стадию, наличие метастазов и чувствительность к химиотерапии при гастроинтестинальном раке. Активно изучается роль трефоиловых факторов и при других злокачественных новообразованиях, в том числе при ретинобластоме, карциноме молочной

Адрес для переписки:

Шестопалов Александр Вячеславович
117997, Россия, Москва, ул. Саморы Машела, 1,
ФГБУ НИИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России.
Тел.: 8 (495) 287-65-70.
E-mail: al-shest@yandex.ru

Contacts:

Alexander V. Shestopalov
117997, Russian Federation, Moscow, Samory Mashela str., 1,
Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology,
Oncology and Immunology.
Phone: +7 (495) 287-65-70.
E-mail: al-shest@yandex.ru

Библиографическое описание:

Шестопалов А.В., Дворников А.С., Борисенко О.В., Тутельян А.В.
Трефоиловые факторы — новые маркеры мукозального барьера
желудочно-кишечного тракта // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 1.
С. 39–46. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-39-46

Citation:

Shestopalov A.V., Dvornikov A.S., Borisenko O.V., Tutelyan A.V. Trefoil
factors — new markers of gastrointestinal mucosal barrier // Russian
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 1,
pp. 39–46. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-39-46

железы, карциноме щитовидной железы. Расширяющийся объем экспериментальных и клинических данных свидетельствует о том, что треоиловые факторы могут рассматриваться как перспективные маркеры желудочно-кишечных и онкологических заболеваний.

Ключевые слова: треоиловые факторы, желудочно-кишечный тракт, муцин, воспаление, апоптоз, ангиогенез, онкогенез.

TREFOIL FACTORS — NEW MARKERS OF GASTROINTESTINAL MUCOSAL BARRIER

Shestopalov A.V.^{a,b,c}, Dvornikov A.S.^a, Borisenko O.V.^a, Tutelyan A.V.^{b,d}

^a Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

^b Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russian Federation

^c Center of the Strategic Planning, Moscow, Russian Federation

^d Central Research Institute of Epidemiology of the Federal Service for Surveillance on Customer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow, Russian Federation

Abstract. Trefoil factors (TFFs) are peptides containing a cloverleaf-like structure, which are synthesized in diverse organs including various regions of the human brain (presumably involved in nervous system development and differentiation), thyroid gland, mammary gland, uterus, prostate gland, conjunctiva, respiratory tract, salivary glands, and gall bladder, which peaks in diverse gastrointestinal tract mucosa: TFF-1 — in the stomach, TFF-2 — in the stomach and duodenum, and TFF-3 — in the gut. An increasing body of studies indicate not only about a widely distributed trefoil factors *in vivo* but also points at their important regulatory functions. In particular, TFFs affect cell adhesion by enhancing epithelial cell migration. Recovery of reversibly damaged epithelial structures called restitution is also facilitated due to TFF-related antiapoptotic effect (anoikis resistance). In contrast, TFF-mediated proangiogenic effects can promote tumor angiogenesis, whereas their immunomodulatory effects include an influence on expression of pro-inflammatory and defense factors (including nitric oxide, cytokines, and defensins). Moreover, TFFs interacting with mucin may increase mucus viscosity, thereby protecting the mucosal layers against ulcerogenic agents. However, bronchial asthma may be aggravated by elevating mucus viscosity in the respiratory tract due to TFF-2. In addition, TFF expression level is associated with pathogenesis of inflammatory diseases in the gastrointestinal tract. It was shown that modality of changes in TFF level might differ depending on anatomical location and severity of lesions. Changing TFF level plays an important role in oncogenesis. For instance, gastric and colorectal cancer is accompanied by upregulated TFF-1 expression. Importantly, TFF amount is considered as a diagnostic predictor due to being associated with carcinogenesis stage, metastasis as well as sensitivity to chemotherapy in gastrointestinal cancer. In addition, a role potentially played by TFFs in other malignancies including retinoblastoma, breast cancer, and thyroid carcinoma has been extensively examined. Thus, an expanding range of experimental and clinical data evidence that trefoil factors may be considered as a promising marker of gastrointestinal and oncology diseases.

Key words: trefoil factors, gastrointestinal tract, mucin, inflammation, apoptosis, angiogenesis, oncogenesis.

Семейство треоиловых факторов представляет собой группу пептидов, синтезирующихся и выделяющихся эпителием слизистых оболочек [51]. Общей их характеристикой является наличие структурного домена в форме листа клевера, который способствует устойчивости треоиловых факторов к протеолитической деградации [27]. Наибольшее количество треоиловых факторов обнаруживается на слизистой желудочно-кишечного тракта, но они также экспрессируются в слюнных железах, желчном пузыре, дыхательной системе, молочной железе, матке, предстательной железе, конъюнктиве, щитовидной железе, в нервной системе [12, 34].

У человека определены 3 разновидности треоиловых факторов: TFF-1 (или PS2), TFF-2 (или спазмолитический полипептид SP) и TFF-3 (или кишечный полипептид ITF) [38]. TFF-1 определяется, главным образом, в поверхностных клетках слизистого слоя желудка, преимущественно антрального отдела, в то время как

TFF-2 находится в слизи, которая вырабатывается как клетками слизистой желудка, так и железами двенадцатиперстной кишки — клетками Бруннера. Преимущественная локализация TFF-3 — тонкий и толстый кишечник, где этот треоиловый фактор вырабатывается бокаловидными клетками [4, 51] (табл. 1).

Эффекты треоиловых факторов многогранны (рис. 1).

Все 3 типа треоиловых факторов усиливают миграцию эпителиальных клеток, тем самым активно участвуя в механизме реституции [18]. Данный эффект TFF-пептидов основан на стимуляции образования комплексов E-кадгерин/ β -катенин в межклеточном веществе. Формирование межклеточных контактов в эпителиальном слое опосредуется E-кадгеринном, взаимодействие которого с β -катенином приводит к дестабилизации межклеточных связей и возможности миграции клеток. Однако индукция миграции клеток под влиянием TFF3 опосреду-

Таблица 1. Номенклатура и локализация трефоиловых факторов

Table 1. Trefoil factor nomenclature and anatomical location

Название Designation	Синонимы Synonyms	Локализация Anatomical location
TFF1	PS2	Желудок Stomach
TFF2	Спазмолитический полипептид SP Spasmolytic polypeptide SP	Желудок, 12-перстная кишка Stomach, duodenum
TFF3	Кишечный полипептид ITF Intestinal trefoil factor ITF	Тонкий и толстый кишечник Small and large intestine

ется также через MAP-киназу (МАРК) независимо от активности эпителиального ростового фактора (EGF-R), тогда как антиапоптотические свойства TFF3 зависят именно от активации EGF-R [29]. Следует заметить и тот факт, что стимулируемая TFF3-пептидом ассоциация E-кадгерина с α -катенином (который связывает E-кадгерин с актином цитоскелета) приводит к инвазии рака толстого кишечника в через серозную оболочку в брюшную полость [15]. Кроме того, TFF3 усиливает экспрессию матрикс-металлопротеиназы-9, повышая инвазивность неопухолевых фибробластов [10]. Таким образом, конститутивная активность гена TFF1 придает клеткам инвазивный фенотип, и гиперэкспрес-

сия TFF1, например, в язва-ассоциированных клеточных линиях (UACL) или в ситуации опухолевой прогрессии может иметь патофизиологическое значение, способствуя миграции и аутокринной стимуляции инвазивных свойств эпителиальных клеток [15, 40].

Влияние трефоиловых пептидов на пролиферацию и апоптоз

В первоначальных исследованиях указывалось, что TFF2 напрямую усиливает пролиферацию клеток толстого кишечника, что, однако, не подтвердилось в последующих экс-

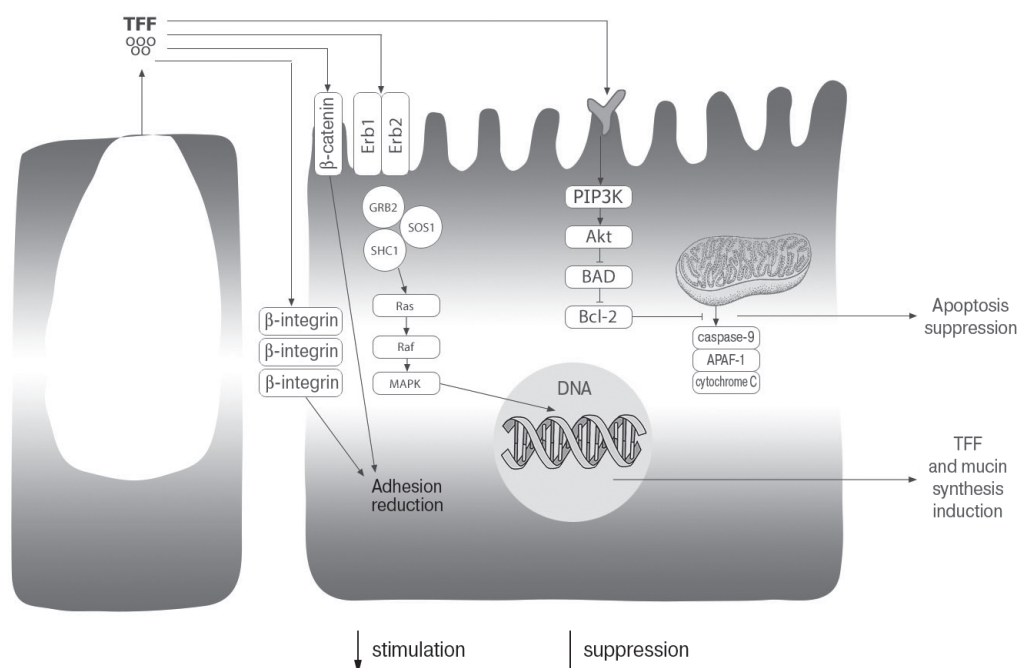


Рисунок 1. Влияние трефоиловых факторов на эпителиальные клетки кишечника. Эффекты, опосредованные взаимодействием с трефоиловых факторов с β -катенинами, интегринами, приводят к уменьшению клеточной адгезии. Одновременно происходит подавление апоптоза через фосфатидил-инозитол-3-киназный путь и усиление экспрессии защитных муцинов и самих трефоиловых факторов

Figure 1. Trefoil factor-triggered effect on intestinal epithelial cells. Interacting with β -catenins integrins, TFFs result in lowered cell adhesion simultaneously associated with suppressed apoptosis via phosphatidylinositol-3-kinase pathway and an upregulated mucin as well as trefoil factor expression

периментальных работах. Напротив, отмечено даже снижение пролиферации клеток желудочно-кишечного тракта под влиянием hTFF3 или TFF1 [8, 44]. В то же время антиапоптотический эффект треоиловых пептидов подтвержден неоднократно [8, 29].

Следует отметить, что антиапоптотическая устойчивость клетки является решающим фактором в отношении эпителиальной реституции — восстановления деятельности обратимо поврежденных структур, когда субстрат-зависимые клетки эпителия (anchorage-dependent epithelial cells) мигрируют в поврежденные области слизистой оболочки. В этих условиях, когда клетка не прикреплена к матриксу, она уязвима для апоптоза (аноиксис) [19]. Было установлено, что TFF3 оказывает выраженный антиапоптотический (аноиксис-резистентный) эффект на энтероциты через активацию NF-κB [11], эпидермальный фактор роста (EGF) [3], активацию Ras/МАПК и Jak/STAT3 сигнальных путей [31, 33].

Влияние треоиловых пептидов на ангиогенез

Все 3 типа TFF-пептида обладают выраженными проангиогенными свойствами, сопоставимыми по выраженности с эффектом сосудисто-эндотелиального ростового фактора (VEGF), и опосредуемыми COX2 и EGF-R сигнальными путями [41]. Экспрессия TFF3 в клетках карциномы желудка человека положительно коррелирует с усилением ангиогенеза в опухоли [13]. TFF3 также могут быть вовлечены в ангиогенез через гипоксия-индуцибельный транскрипционный фактор (HIF-1) [20].

Влияние треоиловых факторов на нервную систему

TFF1 и TFF3 экспрессируются в различных отделах человеческого мозга, хотя и в количествах значительно меньших, чем в слизистых оболочках [34]. Учитывая множественные эффекты треоиловых факторов на клеточную миграцию, пролиферацию, апоптоз и ангиогенез, а также паттерны их экспрессии, предполагается участие треоиловых факторов в развитии и дифференциации нервной системы [7].

Иммуномодулирующие свойства треоиловых пептидов

Результаты многих *in vivo* исследований показали, что терапевтические эффекты TFF-пептидов были связаны со снижением экспрессии провоспалительных молекул и таких медиаторов, как COX2 и iNOS. В большинстве из этих работ не уточняется, был ли этот эффект первичным или развивался вторично на фоне заживления повреждений слизистой оболочки [43, 47]. Тем не менее hTFF2 снижает липополисахарид-индуцированную экспрессию iNOS и продукцию NO в моноцитах [21]. Кроме того, TFF3 усиливает экспрессию фактора, ускоряющего деградацию комплемента (decay-accelerating factor, DAF), который защищает клетки против комплемент-опосредованного повреждения [5]. Противовоспалительные свойства TFF3 могут проявляться через функционирование транскрипционного фактора TWIST, который подавляет NF-κB [52]. Показано, что TFF3 из грудного молока способен регулировать

Таблица 2. Связь треоиловых факторов с воспалительными заболеваниями

Table 2. A link between trefoil factors and inflammatory diseases

Треоиловый фактор Trefoil factor	Заболевания Diseases	Характер изменений Expression level	Источник Reference
TFF1	Воспалительные заболевания кишечника Inflammatory bowel disease	повышение upregulated	25
	Эрозивные гастродуодениты Erosive gastroduodenitis	повышение upregulated	2, 16
	Язвенная болезнь Gastric ulcer	повышение upregulated	4
TFF2	Эрозивные гастродуодениты Erosive gastroduodenitis	повышение upregulated	2
	Язвенная болезнь Gastric ulcer	повышение upregulated	4
TFF3	Воспалительные заболевания кишечника Inflammatory bowel disease	снижение downregulated	25, 45
	Язвенная болезнь Gastric ulcer	повышение upregulated	4

продукцию цитокинов и дефензинов кишечными эпителиальными клетками через PAR-2 рецепторы [6].

Взаимодействие трефоиловых пептидов с муцином

Гипотеза, о том, что трефоиловые пептиды взаимодействуют с муцином, повышая тем самым барьерные свойства слизистой оболочки, базируется на результатах ряда исследований. Помимо ко-локализации клеток, продуцирующих TFF-пептиды и муцин, установлено также, что одни и те же факторы способны стимулировать секрецию и муцина, и TFF-пептидов [22]. Комбинация эффектов трефоиловых факторов и муцина усиливает защиту слизистой оболочки против ulcerогенных агентов, препятствует проникновению протонов через слизь и повышает ее вязкость [46].

В связи с вариациями структуры TFF-пептидов, в том числе формы и количества предполагаемых «муцин-связывающих карманов» [37] и числа цистеиновых остатков, вполне вероятно, что каждый трефоиловый фактор по-разному взаимодействует с муцином. Действительно, было установлено, что hTFF2 наиболее мощно увеличивает вязкость слизи в комбинации с препаратами муцина, в то время как эффект hTFF3 был заметно меньше. Кроме того, при инъекции грызунам TFF2, но не TFF3, увеличивалась вязкость желудочной слизи, и при экспериментальной модели астмы вдыхание TFF2, но не TFF3, ухудшало функциональные дыхательные пробы, вероятно, через повышение вязкости слизи респираторного тракта [23, 30].

Наиболее вязкая слизь (комбинация эффектов TFF2 и муцина) секретируется в желудке и верхнем отделе тонкого кишечника для защиты от соляной кислоты и пищеварительных ферментов, в то время как удаление бактерий из этих отделов ЖКТ менее важно.

Связь с заболеваниями

В последнее время найдена взаимосвязь между уровнем экспрессии трефоиловых факторов и наличием заболеваний ЖКТ (табл. 2).

В частности, показано снижение уровня сывороточного TFF-1 у детей с поверхностным гастродуоденитом, но повышение содержания TFF-1 и TFF-2 у детей с эрозивным гастродуоденитом [2]. Экспрессия TFF1 увеличивается в клетках слизистой желудка при инфицировании *H. pylori* [16]. Показана дисрегуляция в экспрессии TFF при воспалительных заболеваниях кишечника [3, 4, 25], а сывороточный уровень TFF-3 коррелирует с процессом заживления язв при язвенном колите с минимальной активностью, но не при лечении антителами против TNF α [45, 14].

Изменение экспрессии трефоиловых факторов играет важную роль в онкогенезе [9] (табл. 3).

Так, экспрессия TFF1 в тканях опухолей желудка снижена в сравнении с неопухолевыми тканями [17]. Вместе с тем, экспрессия TFF1 повышена в ткани колоректальной карциномы в сравнении со слизистой толстой кишки, а уровень TFF1 в сыворотке больных колоректальной карциномой значительно выше, чем у здоровых лиц [28]. Ряд авторов пришли к заключению, что уровень TFF3 является чувствительным биомаркером стадии рака, наличия

Таблица 3. Связь трефоиловых факторов с онкологическими заболеваниями

Table 3. A link between trefoil factors and oncology diseases

Трефоиловый фактор Trefoil factor	Заболевания Diseases	Характер изменений Expression level	Источник Reference
TFF1	Рак желудка Gastric cancer	снижение downregulated	9
	Колоректальная карцинома Colorectal carcinoma	повышение upregulated	17
	Карцинома молочной железы Breast carcinoma	повышение upregulated	35
TFF3	Рак желудка Gastric cancer	повышение upregulated	49
	Карцинома щитовидной железы Thyroid carcinoma	повышение upregulated	50
	Карцинома эндометрия Endometrial carcinoma	повышение upregulated	36

метастазов, а также показателем чувствительности к химиотерапии при гастроинтестинальном раке [32, 49]. Установлено, что TFF1 может быть ранним маркером диагностики и характера течения карциномы груди [35], а TFF3 — карциномы щитовидной железы [50]. Показано усиление влияния экспрессии треоиловых факторов на клетки ретинобластомы [24].

Также показано участие TFF в патогенезе заболеваний легких [42, 48], гинекологических заболеваний [1, 26, 36], болезни Альцгеймера [39].

Заключение

Расширяющийся объем экспериментальных и клинических данных свидетельствует о том, что треоиловые факторы, выполняя муцин-стабилизирующие, регенераторные, иммуномодулирующие функции, широко представлены в организме, вовлечены в патогенез заболеваний и могут рассматриваться как перспективные маркеры заболеваний желудочно-кишечного тракта, онкологических заболеваний.

Список литературы/References

1. Шестопапов А.В., Мирошниченко Ю.А., Рымашевский А.Н. Содержание муцинов (MUC 5 AC, MUC 6) и треоилового пептида-3 (TFF-3) в эндометрии и цервико-вагинальном секрете у женщин с физиологической беременностью // Фундаментальные исследования. 2013. Т. 12, № 1. С. 104–106. [Shestopalov A.V., Miroshnichenko Yu.A., Rymashevsky A.N. The content of mucins (MUC 5 AC, MUC 6) and trefoil peptide-3 (TFF-3) in endometrium and cervico-vaginal secretion in women with physiological pregnancy. *Fundamental'nye issledovaniya = Fundamental Research*, 2013, vol. 12, no. 1, pp. 104–106. (In Russ.)]
2. Шестопапов А.В., Трофименко О.В., Шестопапова М.А. Уровень треоиловых пептидов (TFF-1 и TFF-2) у детей с хроническими гастродуоденитами // Фундаментальные исследования. 2012. Т. 10, № 2. С. 363–366. [Shestopalov A.V., Trofimenko O.V., Shestopalova M.A. The level of trefoil peptides (TFF-1 and TFF-2) in children with chronic gastroduodenitis. *Fundamental'nye issledovaniya = Fundamental Research*, 2012, vol. 10, no. 2, pp. 363–366. (In Russ.)]
3. Aamann L., Vestergaard E.M., Gronberg H. Trefoil factors in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.*, 2014, vol. 20, no. 12, pp. 3223–3230. doi: 10.3748/wjg.v20.i12.3223
4. Aihara E., Engevik K.A., Montrose M.H. Trefoil factor peptides and gastrointestinal function. *Ann. Rev. Phys.*, 2017, vol. 79, pp. 357–380. doi: 10.1146/annurev-physiol-021115-105447
5. Andoh A., Kinoshita K., Rosenberg I., Podolsky D.K. Intestinal Trefoil Factor Induces Decay-Accelerating Factor Expression and Enhances the Protective Activities Against Complement Activation in Intestinal Epithelial Cells. *J. Immunol.*, 2001, vol. 167, pp. 3887–3893. doi: 10.4049/jimmunol.167.7.3887
6. Barrera G.J., Tortolero G.S. Trefoil factor 3 (TFF3) from human breast milk activates PAR-2 receptors, of the intestinal epithelial cells HT-29, regulating cytokines and defensins. *Bratislavské Lekárske Listy*, 2016, vol. 117, no. 6, pp. 332–339.
7. Belovari T., Bijelić N., Tolušić Levak M., Baus Lončar M. Trefoil factor family peptides TFF1 and TFF3 in the nervous tissue of developing mouse embryo. *Bosn. J. Med. Sci.*, 2015, vol. 15, no. 1, pp. 33–37. doi: 10.17305/bjms.2015.251
8. Bossenmeyer-Pouricé C., Kannan R., Ribieras S., Wendling C., Stoll I., Thim L., Tomasetto C., Rio M.C. The trefoil factor 1 participates in gastrointestinal cell differentiation by delaying G1-S phase transition and reducing apoptosis. *J. Cell. Biol.*, 2002, vol. 157, pp. 761–770. doi: 10.1083/jcb.200108056
9. Busch M., Dünker N. Trefoil factor family peptides—friends or foes? *Biomol. Concepts*, 2015, vol. 6, no. 5–6, pp. 343–359. doi: 10.1515/bmc-2015-0020
10. Chan V.Y., Chan M.W., Leung W.K., Sung J.J., Chan F.K. Intestinal trefoil factor promotes invasion in non-tumorigenic Rat-2 fibroblast cell. *Regul. Pept.*, 2005, vol. 127, pp. 87–94. doi: 10.1016/j.regpep.2004.10.016
11. Chen Y.H., Lu Y., De Plaen I.G., Wang L.Y., Tan X.D. Transcription factor NF-kappaB signals antiaoinic function of trefoil factor 3 on intestinal epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, vol. 274, pp. 576–582. doi: 10.1006/bbrc.2000.3176
12. Choudhary A., Smitha C.N., Suresh D.K. Trefoils: an unexplored natural protective shield of oral cavity. *J. Oral Biol. Craniofac. Res.*, 2015, vol. 5, no 3, pp. 226–231. doi: 10.1016/j.jobcr.2015.06.009
13. Dhar D.K., Wang T.C., Tabara H., Tonomoto Y., Maruyama R., Tachibana M., Kubota H., Naqasue N. Expression of trefoil factor family members correlates with patient prognosis and neoangiogenesis. *Clin. Cancer Res.*, 2005, vol. 11, pp. 6472–6478. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0671
14. Eder P., Stawczyk-Eder K., Korybalska K., Czepulis N., Luczak J., Lykowska-Szuber L., Krela-Kazmierczak I., Linke K., Witowski J. Trefoil factor-3 is not a useful marker of mucosal healing in Crohn's disease treated with anti-TNF- α antibodies. *World J. Gastroenterol.*, 2017, vol. 23, no. 1, pp. 135–140. doi: 10.3748/wjg.v23.i1.135
15. Emami S., Le Floch M., Bruyneel E., Thim L., May F., Westley B., Rio M., Mareel M., Gespach C. Induction of scattering and cellular invasion by trefoil peptides in src- and RhoA-transformed kidney and colonic epithelial. *FASEB J.*, 2001, vol. 15, pp. 351–361. doi: 10.1096/fj.00-0355com
16. Esposito R., Morello S., Villahu M., Eletto D., Porta A., Tosco A. Gastric TFF1 expression from acute to chronic Helicobacter infection. *Front Cell Infect. Microbiol.*, 2017, vol. 7, pp. 434. doi: 10.3389/fcimb.2017.00434
17. Feng G., Zhang Y., Yuan H., Bai R., Zheng J., Zhang J., Song M. DNA methylation of trefoil factor 1 (TFF1) is associated with the tumorigenesis of gastric carcinoma. *Mol. Med. Rep.*, 2014, vol. 9, no. 1, pp. 109–117. doi: 10.3892/mmr.2013.1772
18. Fitzgerald A.J., Pu M., Marchbank T., Westley B.R., May F.E., Boyle J., Yadollahi-Farsani M., Ghosh S., Playford R.J. Synergistic effects of systemic trefoil factor family 1 (TFF1) peptide and epidermal growth factor in a rat model of colitis. *Peptides*, 2004, vol. 25, pp. 793–801. doi: 10.1016/j.peptides.2003.12.022
19. Frisch S.M., Sreaton R.A. Anoinis mechanisms. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 2001, vol. 13, pp. 555–562.

20. Furuta G.T., Turner J.R., Taylor C.T., Hershberg R.M., Comerford K., Narravula S., Podolsky D.K., Colgan S.P. Hypoxia-inducible factor 1-dependent induction of intestinal trefoil factor protects barrier function during hypoxia. *J. Exp. Med.*, 2001, vol. 193, pp. 1027–1034.
21. Giraud A.S., Pereira P.M., Thim L., Parker L.M., Judd L.M. TFF-2 inhibits iNOS/NO in monocytes, and nitrated protein in healing colon after colitis. *Peptides*, 2004, vol. 25, no. 5, pp. 803–809. doi: 10.1016/j.peptides.2004.01.019
22. Gouyer V., Wiede A., Buisine M.P., Dekeyser S., Moreau O., Lesuffleur T., Hoffman W., Huet G. Specific secretion of gel-forming mucins and TFF peptides in HT-29 cells of mucin-secreting phenotype. *Biochim. Biophys. Acta*, 2001, vol. 1539, pp. 71–84.
23. Greeley M.A., Van Winkle L.S., Edwards P.C., Plopper C.G. Airway trefoil factor expression during naphthalene injury and repair. *Toxicol. Sci.*, 2010, vol. 113, no. 2, pp. 453–467. doi: 10.1093/toxsci/kfp268
24. Große-Kreul J., Busch M., Winter C., Pikos S., Stephan H., Dünker N. Forced trefoil factor family peptide 3 (TFF3) expression reduces growth, viability, and tumorigenicity of human retinoblastoma cell lines. *PLoS One*, 2016, vol. 11, no. 9, pp. e0163025. doi: 10.1371/journal.pone.0163025
25. Hensel K.O., Boland V., Postberg J., Zilbauer M., Heuschkel R., Vogel S., Gödde D., Wirth S., Jenke A.C. Differential expression of mucosal trefoil factors and mucins in pediatric inflammatory bowel diseases. *Sci. Rep.*, 2014, vol. 4, pp. 7343. doi: 10.1038/srep07343
26. Henze D., Doecke W.D., Hornung D., Aqueousop I., von Ahsen O., Machens K., Schmitz A.A., Gashaw I. Endometriosis leads to an increased trefoil factor 3 concentration in the peritoneal cavity but does not alter systemic levels. *Reprod. Sci.*, 2017, vol. 24, no. 2, pp. 258–267. doi: 10.1177/1933719116653676
27. Hoffmann W., Jagla W., Wiede A. Molecular medicine of TFF-peptides: from gut to brain. *Histol. Histopathol.*, 2001, vol. 16, no. 1, pp. 319–334.
28. Huang Y.G., Li Y.F., Pan B.L., Wang L.P., Zhang Y., Lee W.H., Zhang Y. Trefoil Factor 1 gene alterations and expression in colorectal carcinomas. *Tumori*, 2013, vol. 99, no. 6, pp. 702–707. doi: 10.1177/030089161309900610
29. Kinoshita K., Taupin D.R., Itoh H., Podolsky D.K. Distinct pathways of cell migration and antiapoptotic response to epithelial injury: structure-function analysis of human intestinal trefoil factor. *Mol. Cell. Biol.*, 2000, vol. 20, pp. 4680–4690.
30. Kjellev S., Nexø E., Thim L., Poulsen S.S. Systemically administered trefoil factors are secreted into the gastric lumen and increase the viscosity of gastric contents. *Br. J. Pharmacol.*, 2006, vol. 149, pp. 92–99. doi: 10.1038/sj.bjp.0706840
31. Le J., Zhang D.Y., Zhao Y., Qui W., Wang P., Sun Y. ITF promotes migration of intestinal epithelial cells through crosstalk between the ERK and JAK/STAT3 pathways. *Sci. Rep.*, 2016, vol. 6, pp. 33014. doi: 10.1038/srep33014
32. Li Q., Wang K., Su C., Fang J. Serum trefoil factor 3 as a protein biomarker for diagnosis of colorectal cancer. *Technol. Cancer Res. Treat.*, 2017, vol. 16, no. 4, pp. 440–445. doi: 10.1177/1533034616674323
33. Lin N., Xu L.F., Sun M. The protective effect of trefoil factor 3 on the intestinal tight junction barrier is mediated by toll-like receptor 2 via a PI3K/Akt dependent mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2013, vol. 440, no. 1, pp. 143–149. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.09.049
34. Madsen J., Nielsen O., Tornøe I., Thim L., Holmskov U. Tissue localization of human trefoil factors 1, 2, and 3. *J. Histochem. Cytochem.*, 2007, vol. 55, pp. 505–513. doi: 10.1369/jhc.6A7100.2007
35. Markičević M., Džodić R., Buta M., Kanjer K., Mandušić V., Nešković-Konstantinović Z., Nikolić-Vukosavljević D. Trefoil factor 1 in early breast carcinoma: a potential indicator of clinical outcome during the first 3 years of follow-up. *Int. J. Med. Sci.*, 2014, vol. 11, no. 7, pp. 663–673. doi: 10.7150/ijms.8194
36. Mhaweche-Fauceglia P., Wang D., Samrao D., Liu S., DuPont N.C., Pejovic T. Trefoil factor family 3 (TFF3) expression and interaction with estrogen receptor (ER) in endometrial adenocarcinoma. *Gynecol. Oncol.*, 2013, vol. 130, no. 1, pp. 174–180. doi: 10.1016/j.ygyno.2013.03.030
37. Muskett F.W., May F.E., Westley B.R., Feeney J. Solution structure of the disulfide-linked dimer of human intestinal trefoil factor (TFF3): the intermolecular orientation and interactions are markedly different from those of other dimeric trefoil proteins. *Biochemistry*, 2003, vol. 42, pp. 15139–15147. doi: 10.1021/bi030182k
38. Ortiz-Masiá D., Hernández C., Quintana E., Velázquez M., Cebrián S., Riaño A., Calatayud S., Esplugues J.V., Barrachina M.D. iNOS-derived nitric oxide mediates the increase in TFF2 expression associated with gastric damage: role of HIF-1. *FASEB J.*, 2010, vol. 24, no. 1, pp. 136–145. doi: 10.1096/fj.09-137489
39. Paterson R.W., Barlett J.W., Blennow K., Fox N.C., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, Shaw L.M., Trojanowski J.Q., Zetterberg H., Schott J.M. Cerebrospinal fluid markers including trefoil factor 3 are associated with neurodegeneration in amyloid-positive individuals. *Transl. Psychiatry*, 2014, vol. 4, no. 7, pp. e419. doi: 10.1038/tp.2014.58
40. Rodrigues S., Nguyen Q.D., Faivre S., Bruyneel E., Thim L., Westley B., May F., Flatau G., Mareel M., Gespach C., Emami S. Activation of cellular invasion by trefoil peptides and src is mediated by cyclooxygenase- and thromboxane A2 receptor-dependent signaling pathways. *FASEB J.*, 2001, vol. 15, pp. 1517–1528.
41. Rodrigues S., Van Aken E., Van Boclaer S., Attoub S., Nguyen Q.D., Bruyneel E., Westley B.R., May F.E., Thim L., Mareel M., Gespach C., Emami S. Trefoil peptides as proangiogenic factors in vivo and in vitro: implication of cyclooxygenase-2 and EGF receptor signaling. *FASEB J.*, 2003, vol. 17, pp. 7–16. doi: 10.1096/fj.02-0201com
42. Royce S.G., Lim C., Muljadi R.C., Samuel C.S., Ververis K., Karagiannis T.C., Giraud A.S., Tang M.L. Trefoil factor-2 reverses airway remodeling changes in allergic airways disease. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 2013, vol. 48, no. 1, pp. 135–144. doi: 10.1165/rcmb.2011-0320OC
43. Soriano-Izquierdo A., Gironella M., Massaguer A., May F.E., Salas A., Sans M., Poulson R., Thim L., Piqué J.M., Panés J. Trefoil peptide TFF2 treatment reduces VCAM-1 expression and leukocyte recruitment in experimental intestinal inflammation. *J. Leukoc. Biol.*, 2004, vol. 75, pp. 214–223. doi: 10.1189/jlb.0803396
44. Soutto M., Peng D., Katcha A., Chen Z., Piazuelo M.B., Washington M.K., Belkhir A., Correa P., El-Rifai W. Activation of β -catenin signalling by TFF1 loss promotes cell proliferation and gastric tumorigenesis. *Gut*, 2015, vol. 64, no. 7, pp. 1028–1039. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307191

45. Srivastava S., Kedia S., Kumar S., Pratap Mouli V., Dhingra R., Sachdev V., Tiwari V., Kurrey L., Pradhan R., Ahuja V. Serum trefoil factor 3 is a biomarker for mucosal healing in ulcerative colitis patients with minimal disease activity. *J. Crohns Colitis*, 2015, vol. 9, no. 7, pp. 575–579. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjv075
46. Thim L., Madsen F., Poulsen S.S. Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2002, vol. 32, pp. 519–527.
47. Vandenbroucke K., Hans W., Van Huysse J., Neiryck S., Demetter P., Remaut E., Rottiers P., Steidler L. Active delivery of trefoil factors *Lactococcus lactis* prevents and by genetically modified heals acute colitis in mice. *Gastroenterology*, 2004, vol. 127, pp. 502–513.
48. Wiils-Karp M., Rani R., Dienger K., Lewkowich I., Fox J.G., Perkins C., Lewis L., Finkelman F.D., Smith D.E., Bryce P.J., Kurt-Jones E.A., Wang T.C., Sivaprasad U., Hershey G.K., Herbert D.R. Trefoil factor 2 rapidly induces interleukin 33 to promote type 2 immunity during allergic asthma and hookworm infection. *J. Exp. Med.*, 2012, vol. 209, no 3, pp. 607–622. doi: 10.1084/jem.20110079
49. Xiao L., Liu Y.P., Xiao C.X., Ren J.L., Guleng B. Serum TFF3 may be a pharmacodynamic marker of responses to chemotherapy in gastrointestinal cancers. *BMC Clin. Pathol.*, 2014, vol. 14, pp. 26. doi: 10.1186/1472-6890-14-26
50. Xue G., Huang J., Zhang H., Zhang W., Wu J., Shang X. The expression and significance of trefoil factor 3 and SDF-1/CXCR4 biological axis in papillary thyroid carcinoma. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, 2014, vol. 28, pp. 108–112.
51. Xue L., Aihara E., Wang T.C., Montrose M.H. Trefoil factor 2 requires Na/H exchanger 2 activity to enhance mouse gastric epithelial repair. *J. Biol. Chem.*, 2011, vol. 286, no. 44, pp. 38375–38382. doi: 10.1074/jbc.M111.268219
52. Zhu Y.Q., Tan X.D. TFF3 modulates NF-kappaB and a novel negative regulatory molecule of NF- kappa B in intestinal epithelial cells via a mechanism distinct from TNF- α . *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2005, vol. 289, pp. C1085–C1093. doi: 10.1152/ajpcell.00185.200

Авторы:

Шестопалов А.В., д.м.н., профессор, зам. директора Высшей школы молекулярной и экспериментальной медицины ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии (НМИЦ ДГОИ) имени Дмитрия Рогачева МЗ РФ, Москва, Россия; зав. кафедрой биохимии и молекулярной биологии ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет (ФГБОУ ВО РНИМУ) имени Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия; профессор ФГБУ Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью (ФГБУ ЦСП) МЗ РФ, Москва, Россия;

Дворников А.С., д.м.н., декан лечебного факультета ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия;

Борисенко О.В., к.м.н., доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия;

Тутельян А.В., член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, зав. отделом молекулярной иммунологии, инфектологии и фармакотерапии и лабораторией молекулярной визуализации ФГБУ НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева МЗ РФ, Москва, Россия; зав. лабораторией инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия.

Authors:

Shestopalov A.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Vice Director of the High School of Molecular and Experimental Medicine at Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russian Federation; Head of the Department of Biochemistry and Molecular Biology, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation; Professor of the Center of the Strategic Planning, Moscow, Russian Federation;

Dvornikov A.S., PhD, MD (Medicine), Dean of the Medical Faculty, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation;

Borisenko O.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation;

Tutelyan A.V., RAS Corresponding Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Molecular Immunology, Infectology and Pharmacotherapy, and the Laboratory of Molecular Visualization, Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russian Federation; Head of the Laboratory of Infections Associated with the Provision of Medical Care, Central Research Institute of Epidemiology of the Federal Service for Surveillance on Customer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 18.05.2018
Отправлена на доработку 13.03.2019
Принята к печати 15.03.2019

Received 18.05.2018
Revision received 13.03.2019
Accepted 15.03.2019

ГЕКСОН КАК ОСНОВНОЙ БЕЛОК ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ, ВЫЯВЛЯЮЩИХ АДЕНОВИРУСЫ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ

Т.А. Тимошичева¹, Я.А. Забродская^{1,2}, И.В. Амосова¹

¹ ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

² НИЦ «Курчатовский институт» — ПИЯФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Инфекционные заболевания вирусной этиологии являются одной из важнейших проблем здравоохранения. В России ежегодно регистрируется около 50 млн случаев инфекционных заболеваний, до 90% из которых приходится на долю острых респираторных вирусных инфекций. В неэпидемические по гриппу сезоны в качестве основных возбудителей ОРВИ выступают аденовирусы, респираторно-синцитиальный вирус, вирусы парагриппа и др. Инфекционные заболевания, вызванные аденовирусами, характеризуется полиморфизмом проявлений, что делает их интересными для изучения и в то же время сложными для клинической диагностики. Применение быстрых, чувствительных и специфичных тестов является актуальным для рутинной клинической лабораторной практики. Для дифференциальной диагностики аденовирусных инфекций в России широко применяются иммуноферментный и иммунофлуоресцентный анализ с применением поликлональных специфичных сывороток, характер и спектр реагирования которых зависит от особенностей иммунного ответа животного-продуцента и состава вырабатываемых антител. Включение в состав современных иммунологических тестов моноклональных антител, направленных к определенным антигенным детерминантам в составе вируса, определяет высокую чувствительность, специфичность и необходимый уровень стандартизации препаратов. Гексон аденовирусов содержит родоспецифические антигены и обладает достаточно консервативной аминокислотной последовательностью среди аденовирусов разных типов. Кроме того, этот белок синтезируется в инфицированных клетках в больших количествах и может быть получен в нативной форме, что определило его использование в качестве иммуногена для получения моноклональных антител, способных выявлять аденовирусы различных типов. Получена панель моноклональных антител к гексону аденовируса. Изучены их биологические и диагностические свойства. По результатам вестерн блоттинга можно заключить, что все моноклональные антитела связываются с олигомерами гексона в составе аденовируса. Специфическая активность новых моноклональных антител в отношении аденовирусов разных типов исследована методами иммуноферментного и непрямого иммунофлуоресцентного анализа. Наибольшей специфической активностью в иммуноферментном анализе обладают моноклональные антитела 4В7 и 6В12, титр антител составил 10^{-6} . Наибольшей активностью в отношении различных типов аденовирусов в непрямом иммунофлуоресцентном анализе обладали моноклональные антитела 6В12, при использовании которых в инфицированных аденовирусами 3, 4, 6 и 19 типов клетках наблюдалась яркая гранулярная флуоресценция

Адрес для переписки:

Тимошичева Татьяна Александровна
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 15/17,
ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России.
Тел.: 8 (812) 499-15-84.
E-mail: tatianatim@mail.ru

Contacts:

Tatyana A. Timoshicheva
117997, Russian Federation, St. Petersburg, prof. Popov str., 15/17,
Smorodintsev Research Institute of Influenza.
Phone: +7 (812) 499-15-84.
E-mail: tatianatim@mail.ru

Библиографическое описание:

Тимошичева Т.А., Забродская Я.А., Амосова И.В. Гексон как основной белок для получения моноклональных антител, выявляющих аденовирусы различных типов // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 1. С. 47–56. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-47-56

Citation:

Timoshicheva T.A., Zabrodskaya Ya.A., Amosova I.V. Hexon-based scaffold for generation of diagnostic monoclonal antibodies against diverse adenovirus types // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 47–56. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-47-56

преимущественно ядерной локализации. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования новых моноклональных антител 4B7 и 6B12 для конструирования современных диагностических тест-систем.

Ключевые слова: аденовирус, гексон, моноклональные антитела, диагностика, иммуноферментный анализ, иммунофлуоресцентный анализ.

HEXON-BASED SCAFFOLD FOR GENERATION OF DIAGNOSTIC MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST DIVERSE ADENOVIRUS TYPES

Timoshicheva T.A.^a, Zabrodskaya Ya.A.^{a,b}, Amosova I.V.^a

^a Smorodintsev Research Institute of Influenza of the Ministry of Healthcare, St. Petersburg, Russian Federation

^b Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of NRC "Kurchatov Institute", St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Infectious diseases hold one of the most crucial places in healthcare. In Russia, annual prevalence of infectious diseases comprises around 50 million cases, wherein acute respiratory viral infections cover up to 90%. In non-influenza (non-peak) season, adenoviruses, respiratory syncytial virus, parainfluenza viruses etc. represent the main infectious cause of acute respiratory viral infections. Adenovirus-induced infections are characterized by heterogeneous manifestations posing them both as an interesting challenge, yet difficult in clinical diagnostics. Use of rapid, sensitive and specific tests is of high priority for routine clinical laboratory practice. In Russia, differential diagnostics of adenoviral infections includes a widely used ELISA and immunofluorescence analysis based on polyclonal specific sera. Importantly, a pattern and range of specific reactions depend on origin of animal-derived antibodies and their composition. Introduction of monoclonal antibodies specific to certain viral antigenic epitopes ensures high sensitivity and specificity allowing to reach an expected standardization level for such diagnostic products. Adenovirus hexon protein bears genus-specific antigens and relatively conserved amino acid sequence among diverse adenoviruses. Moreover, it is produced at high amount in infected cells and may be purified in a native form. Moreover, it is produced at high amount in infected cells and may be purified in a native form, thereby posing it as a promising antigen for producing monoclonal antibodies able to detect various adenoviruses types. A panel of adenovirus hexon-specific monoclonal antibodies was generated, which were further examined for biological and diagnostics properties. Western blotting data allowed to conclude that all of monoclonal antibodies generated by us were able to bind to adenovirus hexon oligomers. Specific activity of the new monoclonal antibodies against various adenovirus types was examined by ELISA and indirect immunofluorescence assay. In particular, monoclonal antibodies 4B7 and 6B12 were shown display top specific activity measured by ELISA (antibody titers comprised as high as 10^{-6}). Moreover, monoclonal antibody 6B12 exhibited peak hexon-specific activity assessed in indirect immunofluorescence assay (against various adenovirus types), which resulted in prominent granular nuclear fluorescence in cells infected with adenovirus types 3, 4, 6, and 19. Thus, the data obtained evidence that monoclonal antibodies developed 4B7 and 6B12 may be potentially used for developing high-quality adenovirus-specific diagnostic assays.

Key words: adenovirus, hexon, monoclonal antibodies, diagnostics, enzyme-linked immunosorbent assay, immunofluorescence assay.

Инфекционные заболевания вирусной этиологии остаются одной из важнейших проблем здравоохранения. В России ежегодно регистрируется около 50 млн случаев инфекционных заболеваний, до 90% из которых приходится на долю острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) [3]. В неэпидемические по гриппу сезоны в качестве основных возбудителей ОРВИ выступают аденовирусы (АВ), респираторно-синцитиальный вирус (РСВ), вирусы парагриппа и др. [19].

АВ обычно вызывают инфекционные заболевания, поражающие верхний или нижний отделы дыхательного тракта, глотку, конъюнктиву или желудочно-кишечный тракт. Вспышки АВ инфекций (АВИ) могут возникать в течение всего года не только среди лиц с ослабленным иммунитетом, но и среди здоровых детей или взрослых в закрытых коллективах (в частнос-

ти, военнослужащих), а также в домах престарелых, специализированных медицинских учреждениях и летних лагерях. Доля АВ среди детей и молодых людей призывного возраста в общей структуре ОРВИ может достигать 30 и 64,6% соответственно [4, 20]. В большинстве случаев для заболеваний, вызванных АВ, характерно благоприятное течение в виде респираторных заболеваний. Однако случаи развития диссеминированной инфекции или пневмонии с фатальными последствиями могут возникать как у иммунокомпетентных пациентов, так и у пациентов с ослабленным иммунитетом.

По биологическим, химическим, иммунологическим и морфологическим свойствам АВ делятся на 7 групп (А-Г). Патогенными для человека являются около 50 типов АВ, что определяет многообразие клинических проявлений АВИ (табл. 1) [1].

Таблица 1. Клинические проявления аденовирусной инфекции в зависимости от типа аденовируса

Table 1. Adenovirus type-specific clinical manifestations

Группа АВ AV group	Типы АВ AV types	Характер заболевания Course of the disease	Группы риска Risk groups
A	12, 18, 31, 61	Гепатиты, гастроэнтериты Hepatitis, gastroenteritis	Дети, пациенты с трансплантацией органов Children, organ transplantation patients
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50	ОРВИ, острый геморрагический цистит, гастроэнтериты ARVI, acute hemorrhagic cystitis, gastroenteritis	Новобранцы, курсанты военных училищ, дети Recruits, military school cadets, children
C	1, 2, 5, 6	Фарингиты Pharyngitis	Дети Children
D	8–10, 13, 15, 17, 19, 19a, 19p, 20, 22–30, 32, 33, 36–39, 42–49, 51	Эпидемические и спорадические кератоконъюнктивиты Epidemic and sporadic keratoconjunctivitis	Все группы населения All human cohorts
E	4	ОРВИ, фолликулярные конъюнктивиты ARVI, follicular conjunctivitis	Новобранцы, курсанты военных училищ, все группы населения Recruits, military school cadets, all human cohorts
F	40	Гастроэнтериты Gastroenteritis	Дети младшего возраста Young children
G	41, 52	Гастроэнтериты Gastroenteritis	Дети младшего возраста Young children

В настоящее время для дифференциальной диагностики АВИ в клинических материалах используют методы обнаружения ДНК [полимеразная цепная реакция (ПЦР)] и специфических вирусных антигенов [метод иммунофлуоресценции (ИФЛ); иммуноферментный анализ (ИФА)]. В России широко применяются ИФА и ИФЛ с применением поликлональных специфичных сывороток. Основным недостатком этого типа иммунореагентов является нестабильность их антигенового состава, зависящая от особенностей иммунного ответа продуцента. Включение в состав современных иммунологических тестов моноклональных антител (МКА), направленных к определенным антигенным детерминантам в составе вируса, определяет высокую чувствительность, специфичность и необходимый уровень стандартизации препаратов [10].

Аденовирус представляет собой ДНК-содержащий вирус, вирион которого имеет правильную геометрическую форму икосаэдра, образованного белками гексона, пентона и фибриллы. В каждой вирусной частице содержится по 12 молекул белков пентона и фибриллы, которые несут в своем составе типоспецифичные антигены, что не позволяет выявлять разные типы обширного семейства АВ с помощью МКА, направленных к этим белкам. Белок гексона составляет около 60% массы вирионов АВ и несет в своем составе обширный консервативный участок с родоспецифическими детерминантами. Вариабельность аминокислотного состава этого участка гексона составляет менее 15% [8]. В инфицированных клетках гексон

синтезируется в избытке: только 20–30% белка используется для сборки вирусных частиц, что дает возможность сравнительно легко получать гексон в нативной форме и использовать полученные к нему МКА для детекции АВ различных типов в клинических материалах.

В лаборатории биотехнологии диагностических препаратов ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России получена панель МКА, направленных к гексону АВ, исследованы их биологические свойства.

Материалы и методы

Клеточные культуры и вирусы. Клеточные культуры А 549 (карцинома легкого человека), МА-104 (эпителий почки эмбриона макаки), АВ 3, 4, 6 и 19 типов и РСВ (штамм Long) получены из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

Получение очищенных вирусных концентратов. АВ накапливали в культуре клеток А 549 в течение 72 ч, РСВ — в культуре клеток МА-104 в течение 120 ч при 37°C до появления выраженного цитопатического действия вирусов. Из вирусосодержащей культуральной жидкости (ВКЖ) методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы получали очищенные АВ и РСВ [17].

Получение очищенного гексона. Гексон получали из ВКЖ АВ 6 типа согласно [7].

Оптическая микроскопия проводилась на световом микроскопе Axiovert 40C при увеличении ×100 (Karl Zeiss, Германия).

Электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле (ЭФ в ПААГ) проводили в денатурирующих условиях согласно [13] с использованием 8% разделяющего и 4% концентрирующего гелей. Образцы (гексон АВ 6 типа в концентрации 0,2 мг/мл; очищенный концентрат АВ 6 типа в концентрации 0,5 мг/мл) подготавливали в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях, с добавлением или без добавления бета-меркаптоэтанола в буфер Лэммли соответственно, денатурацию проводили при 70°C в течение 20 мин. Для получения олигомеров гексона в частично денатурирующих условиях очищенный концентрат АВ 6 типа в буфере Лэммли без бета-меркаптоэтанола выдерживали при +4°C в течение 1,5 ч [9]. На дорожку 15-луночного геля наносили по 5 мкл образца. В качестве маркера молекулярных масс использовали Precision Plus Protein Unstained Standards (Bio-Rad, США). После окончания ЭФ гель окрашивали коллоидным раствором Кумасси согласно [5]. Изображения геля визуализировали при помощи системы ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, США). Электрофоретическую подвижность окрашенных зон оценивали по маркеру молекулярных масс в программном обеспечении прибора.

Масс-спектрометрия. Ферментативный гидролиз белков в геле трипсином проводили согласно [15], минуя этап восстановления дисульфидных связей и их модификации йод-ацетамидом. Вырезанные фрагменты геля, содержащие интересующие окрашенные зоны, отмывали от красителя дважды по 15 мин 30 мМ NH₄HCO₃, 40% ацетонитрилом и обезвоживали ацетонитрилом. После полного испарения ацетонитрила к гелю добавляли 20 мкг/мл свиного трипсина (Promega, США) в 50 мМ NH₄HCO₃. Ферментативный гидролиз проводили в течение 5 ч при 37°C. Реакцию останавливали раствором 0,5% трифторуксусной кислоты с 10% ацетонитрила. Полученные триптические пептиды смешивали с матрицей HCCA (Bruker, США), наносили на мишень GroundSteel (Bruker, США) и анализировали на MALDI-TOF/TOF масс-спектрометре ultrafleXtreme (Bruker, США) в режиме регистрации положительных ионов. Для каждого спектра суммировали 5000 импульсов лазера. Идентификация белков осуществлялась с использованием MASCOT (matrixscience.com) при обращении к базе данных NCBI (National Center of Biotechnology Information, ncbi.nlm.nih.gov). В качестве переменных модификаций указывали окисление метионинов. Погрешность ограничили 20 ppm.

Приготовление тест-объектов (ТО). Монослойные клеточные культуры А 549 и МА-104, выращенные в 96-луночных культуральных

планшетах (Nunc, Дания), заражали АВ (3, 4, 6 и 19 типов) и РСВ, соответственно, в дозе 100 ТЦД₅₀ и инкубировали в СО₂-инкубаторе при температуре 37°C. Через 72 ч после заражения планшеты фиксировали 80% охлажденным ацетоном и хранили при температуре 4°C в течение месяца.

Получение гибридом-продуцентов МКА к гексону АВ. МКА получены в лаборатории биотехнологии диагностических препаратов ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России по методу [12]. Мышей линии BALB/c двукратно иммунизировали гексоном по 50 и 30 мкг на мышью с интервалом в 6 недель. Через 3 дня после второй иммунизации проводили гибридизацию спленоцитов иммунизированных мышей с клетками мышиной миеломы. Через 2 недели после слияния проводили тестирование антител, продуцируемых гибридомами.

Метод микрокультурального ИФА (мКИФА) использован для первичного тестирования гибридом-продуцентов МКА [2]. Культуральную среду, содержащую исследуемые МКА, наносили на ТО по 100 мкл/лунку. Связавшиеся МКА детектировали при помощи пероксидазного конъюгата к IgG мыши (Sigma, США) с последующим добавлением субстратной смеси, содержащей тетраметилбензидин. Оптическую плотность регистрировали при длине волны 450 нм (ОП₄₅₀).

Получение МКА к гексону АВ в асцитной форме. Гибридомы, продуцирующие МКА с требуемым спектром реагирования, реклонировали и вводили в мышью линии BALB/c для накопления МКА в асцитной форме. Фракции иммуноглобулинов из асцитной жидкости выделяли двукратным высаливанием сульфатом аммония.

Вестерн блоттинг. Неокрашенный ПААГ после ЭФ, нитроцеллюлозную мембрану (0,2 мкм, Bio-Rad, США) и фильтровальную бумагу для блоттинга (Bio-Rad, США) инкубировали 15 мин в 49,7 мМ трис, 38,6 мМ глицин, 0,0375% додецилсульфат натрия, 20% этанол. Полусухой перенос проводили 40 мин в ячейке Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, США) по протоколу производителя. Перенос белков на мембрану подтверждали ее окрашиванием ATX Ponceau S red (Fluka, Германия). Мембрану отмывали дважды фосфатно-солевым буфером (ФСБ), содержащим 0,5% твин-20 (ФСБТ), после чего инкубировали в 5% блокирующем реагенте (Bio-Rad, США), разведенном в ФСБТ, в течение 16 ч. Исследуемые МКА и вторичные антитела GAM-HRP (Bio-Rad, США), разбавляли в 5% блокирующем реагенте (Bio-Rad, США), разведенном в ФСБТ, и инкубировали по 1 ч с промежуточной отмывкой ФСБТ. Для последующей визуализации маркера молекулярных

масс вместе со вторыми антителами добавляли StrepTactin-HRP conjugate (Bio-Rad, США). Мембраны проявляли Clarity Western ECL (Bio-Rad, США), хемилюминесценцию регистрировали на ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, США).

Определение специфической активности МКА методом ИФА. В 96-луночные планшеты (Медполимер, Россия), предварительно сенсibilизированные очищенным АВ 6 типа в концентрации 2,5 мкг/мл в течение 16 ч, вносили 10-кратные разведения МКА, начиная с концентрации 5 мкг/мл. Связавшиеся с АВ антигеном МКА детектировали с помощью пероксидазного конъюгата антител к IgG мыши (Sigma, США). В качестве отрицательного контроля использовали очищенный РСВ в концентрации 2,5 мкг/мл.

Непрямой иммунофлуоресцентный анализ (НИФЛ). Двукратные разведения МКА, начиная с концентрации 20 мкг/мл, вносили в лунки ТО. Через 30 мин связавшиеся с АВ антигеном МКА детектировали конъюгатом флуоресцеин изотиоцианата (ФИТЦ) с антимышиными антителами (Sigma, США). Окрашенные ТО анализировали под люминесцентным микроскопом Axioskop 40 (Karl Zeiss, Германия) при увеличении $\times 400$.

Получение пероксидазных конъюгатов МКА осуществляли периодатным методом в соответствии с [16].

Конкурентный ИФА. 96-луночные планшеты (Медполимер, Россия) сенсibilизировали очищенным АВ 6 типа в концентрации 2,5 мкг/мл в течение 16 ч при 4°C. Затем в лунки вносили равные объемы 10-кратных разведений МКА и пероксидазных конъюгатов МКА в различных сочетаниях. Для оценки степени ингибирования связывания пероксидазных конъюгатов МКА в присутствии немеченых МКА сравнивали активность маркерного фермента иммунокомплекса, связанного с твердой фазой, в лунках с добавлением и без добавления МКА.

Результаты и обсуждение

Гексон АВ содержит родоспецифические антигены и обладает достаточно консервативной аминокислотной последовательностью среди АВ различных типов. Кроме того, этот белок синтезируется в инфицированных клетках в больших количествах и может быть получен в нативной форме, что определяет перспективность его использования в качестве иммуногена для получения МКА, способных выявлять АВ всех типов.

Гексон АВ 6 типа в кристаллическом виде (рис. 1) был получен в лаборатории биотехнологии диагностических препаратов ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России.

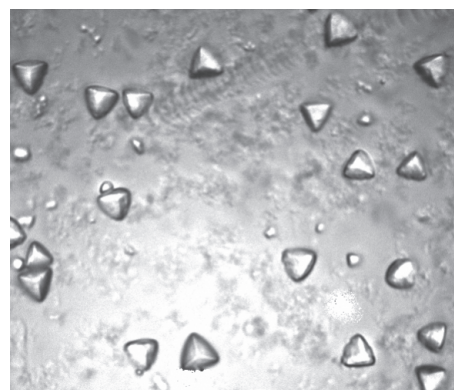


Рисунок 1. Очищенный гексон АВ 6 типа в кристаллическом виде

Figure 1. Crystallized purified AV type 6 hexon

Примечание. Световая микроскопия, увеличение $\times 100$
Note. Light microscopy, magnification $\times 100$

Для подтверждения аминокислотной последовательности и чистоты полученного гексона АВ 6 типа был проведен ЭФ в ПААГ (рис. 2) с последующей масс-спектрометрической идентификацией белков. В качестве контроля использовали очищенный АВ 6 типа. Оба образца были подготовлены в условиях образования мономера и олигомера гексона.

При окрашивании ПААГ раствором Кумасси (рис. 2) были выявлены белковые зоны, по элек-

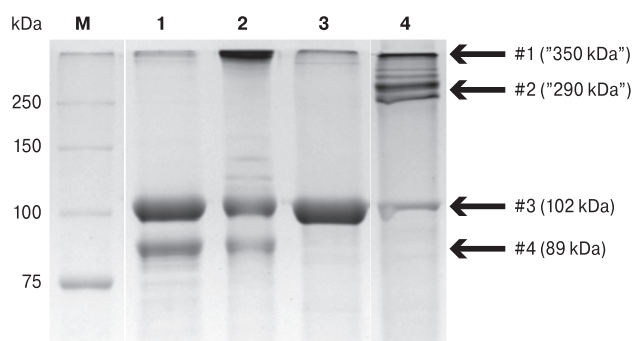


Рисунок 2. Результаты ЭФ в ПААГ. Окрашивание коллоидным раствором Кумасси

Figure 2. Hexon-based polyacrylamide gel electrophoresis data. Stained with colloidal Coomassie solution

1 — очищенный гексон в условиях образования мономера;
2 — очищенный гексон в условиях образования олигомера;
3 — очищенный концентрат АВ в условиях образования мономера гексона; 4 — очищенный концентрат АВ в условиях образования олигомера гексона.
M — маркер молекулярных масс.

1 — purified hexon under monomer-forming conditions;
2 — purified hexon under oligomer-forming conditions;
3 — purified AV under hexon monomer-forming conditions;
4 — purified AV under hexon oligomer-forming conditions.
M — molecular weight marker.

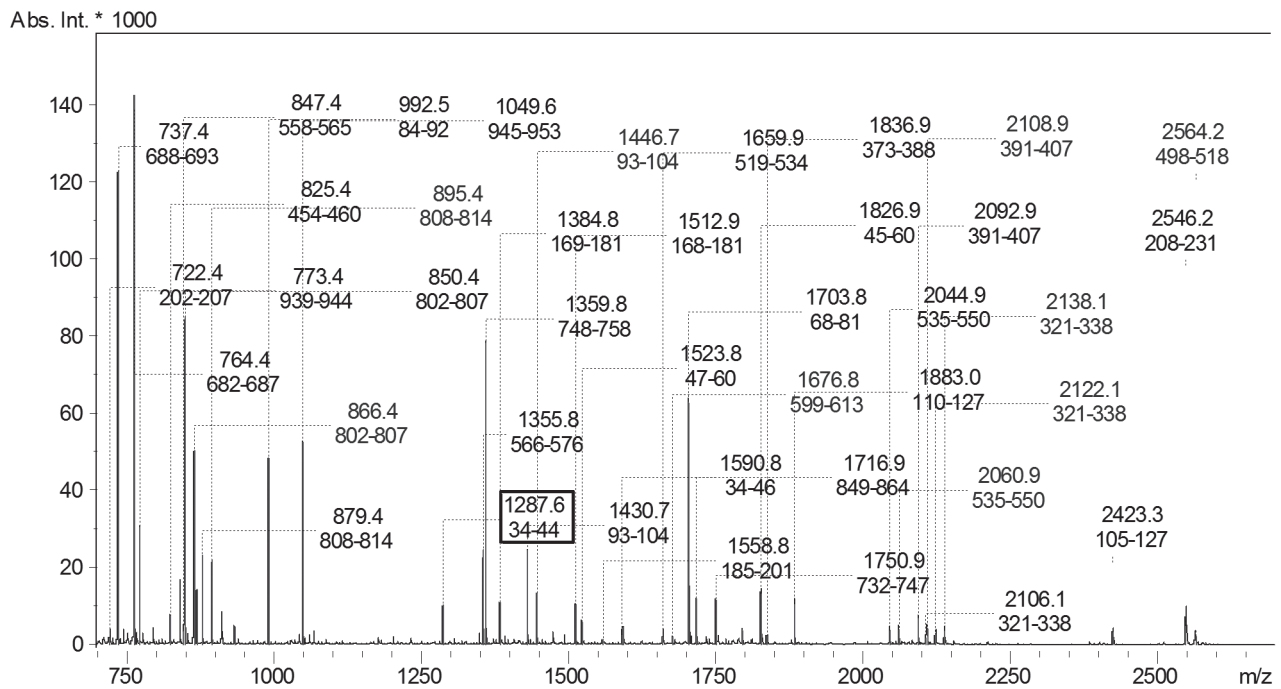


Рисунок 3. Фрагмент характерного MALDI масс-спектра, по которому был достоверно идентифицирован гексон АВ 6 типа

Figure 3. Hexon MALDI mass spectral fragmentation pattern. A hexon of AV type 6 was reliably identified

Примечание. Отмечены ионы, найденные в последовательности белка. Для каждого иона указаны его m/z (Da) и номер соответствующего ему аминокислотного остатка.

Note. Hexon-specific ions including m/z (Da) and position of relevant amino acid residue are denoted.

трофоретической подвижности соответствующие 90–100 kDa (#3 и #4) и около 300 kDa (#1 и #2) и представляющие собой по литературным данным мономеры и олигомеры гексона соответственно [11].

Для подтверждения аминокислотной последовательности гексона и его присутствия в зонах ПААГ, отмеченных стрелками на рисунке 2, они были вырезаны и подвергнуты масс-спектрометрическому исследованию. Характерный масс-спектр представлен на рисунке 3.

Методом MALDI масс-спектрометрии во всех образцах был достоверно идентифицирован белок «hexon [Human adenovirus 6]». Величина Score составила 412 при пороговом значении 76 (в случае, если Score превышает пороговое значение, идентификация считается достоверной, $p < 0,05$). На рисунке 3 отмечены ионы, найденные в последовательности белка. Для каждого иона указаны его m/z и номер соответствующего ему аминокислотного остатка (а.о.). Так, m/z обведенного в рамку иона — 1287,6 Da, а номера соответствующих ему а.о. в последовательности гексона — 34–44.

Очищенный гексон далее был использован для иммунизации мышей с целью получения специфичных к гексону МКА. При слиянии спленоцитов иммунизированных мышей с клетками миеломы было получено 11 гибридом, первичный скрининг которых проведен

методом мКИФА с использованием АВ, принадлежащих к различным группам (АВ 3 типа — группа В, АВ 4 типа — группа Е, АВ 6 типа — группа С, АВ 19 типа — группа D). Результаты мКИФА представлены в таблице 2.

При анализе результатов мКИФА положительными считали пробы, значение ОП₄₅₀ в которых превышало значение ОП₄₅₀ отрицательных контролей (неинфицированная клеточная культура А 549, гетерологичный РСВ) более, чем в 2 раза. МКА 2С3, 4G10, 6G10 взаимодействовали только с АВ 6 типа. МКА 2Н7, 3F12, 4В7, 5D4, 5E11, 6В12 специфически реагировали с АВ 3, 4, 6 и 19 типов. МКА 5А8 неспецифически взаимодействовал с отрицательными контролями. МКА 3F6 не обладали активностью в мКИФА.

Таким образом, по результатам первичного скрининга было отобрано 9 гибридом, продуцирующих МКА, специфично реагирующие с АВ 6 типа при отсутствии неспецифического взаимодействия с гетерологичным вирусом (РСВ) и неинфицированными клетками А 549.

Направленность полученных МКА к гексону была подтверждена методом вестерн-блоттинга (рис. 4).

По результатам вестерн-блоттинга можно заключить, что все МКА связываются преимущественно с олигомерами гексона в составе АВ, полученными в частично денатурирую-

Таблица 2. Результаты первичного скрининга моноклональных антител в микрокультуральном иммуноферментном анализе

Table 2. Baseline monoclonal antibody screening by cell-ELISA

МКА* MAbs*	ОП ₄₅₀ при тестировании клонов/OD ₄₅₀ signal					
	Типы АВ AV types				Отрицательные контроли Negative controls	
	АВ3 AV3	АВ6 AV6	АВ4 AV4	АВ19 AV19	РСВ RSV	А 549 A 549
2С3	0,040	0,91	0,058	0,051	0,052	0,054
2Н7	0,126	1,177	0,178	0,328	0,040	0,054
3F12	0,165	1,021	0,636	1,009	0,046	0,049
4В7	0,131	1,436	1,094	0,554	0,030	0,057
4G10	0,039	0,253	0,052	0,040	0,023	0,056
5D4	0,172	0,662	0,316	0,444	0,056	0,044
5E11	0,099	0,975	0,175	0,155	0,044	0,049
6B12	0,105	1,374	0,282	0,138	0,057	0,051
6G10	0,047	1,113	0,033	0,074	0,042	0,046
5A8	0,963	0,809	0,569	0,447	0,555	0,585
3F6	0,049	0,069	0,040	0,050	0,049	0,058

Примечание. *Культуральная гибридная жидкость в разведении 1:10.

Note. *Hybridoma-derived culture medium diluted at 1:10 ratio.

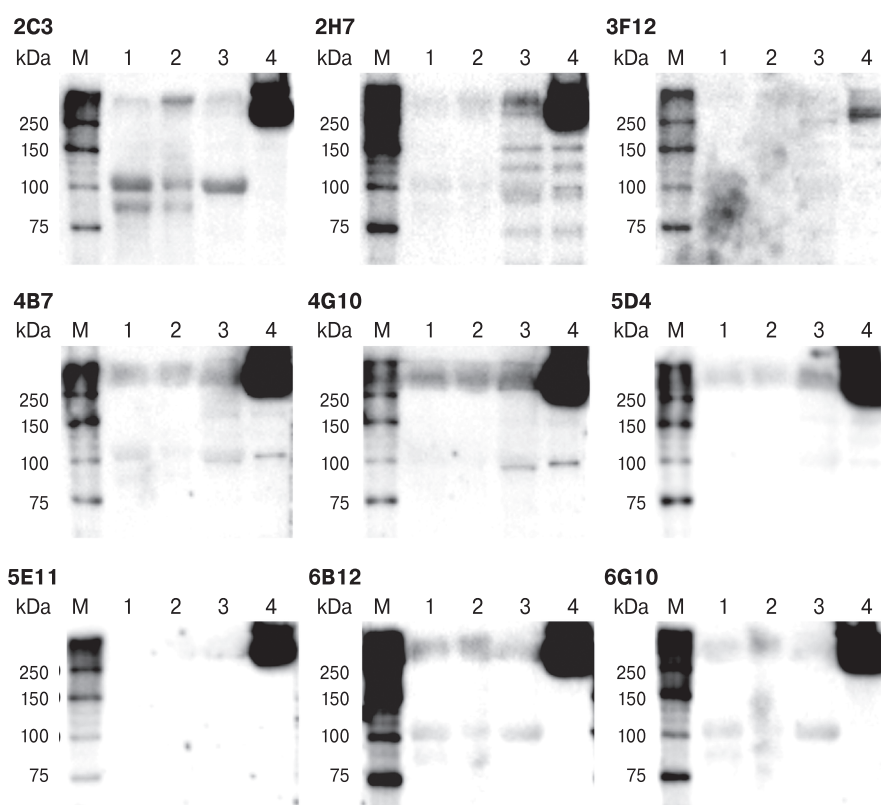
**Рисунок 4. Результаты изучения связывания полученных МКА с гексоном АВ 6 типа методом вестерн-блоттинга**

Figure 4. AV type 6 hexon-specific binding of monoclonal antibodies examined by Western blot

1 — очищенный гексон в условиях образования мономера; 2 — очищенный гексон в условиях образования олигомера; 3 — очищенный концентрат АВ в условиях образования мономера гексона; 4 — очищенный концентрат АВ в условиях образования олигомера гексона. М — маркер молекулярных масс.

1 — purified hexon under monomer-forming conditions; 2 — purified hexon under oligomer-forming conditions; 3 — purified AV under hexon monomer-forming conditions; 4 — purified AV under hexon oligomer-forming conditions. M — molecular weight marker.

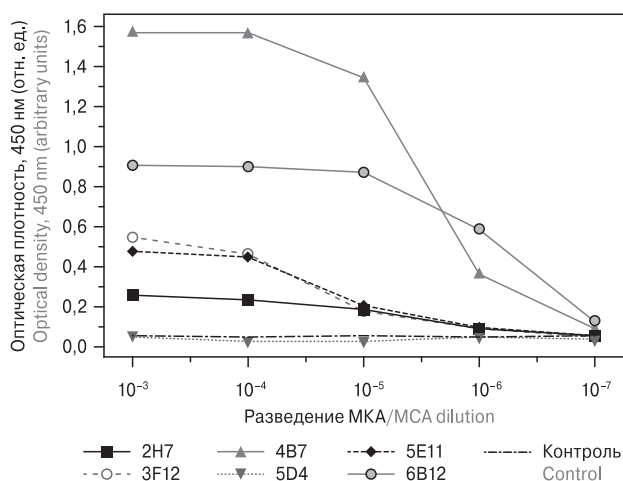


Рисунок 5. Активность выделенных из асцитной жидкости МКА (ОП₄₅₀) в отношении АВ 6 типа в зависимости от их разведения, определенная методом ИФА

Figure 5. Activity of ascites-derived AV type 6-specific serially diluted monoclonal antibodies assessed by ELISA (OD₄₅₀)

Примечание. На стадии захвата использован очищенный АВ 6 типа в концентрации 2,5 мкг/мл, на стадии детекции — пероксидазный конъюгат антител к IgG мыши (Sigma, США). В качестве отрицательного контроля выступал гетерологичный РСВ.

Note. For primary capture, purified AV 6 type was used at a concentration of 2.5 µg/ml. For detection, peroxidase-conjugated secondary antibodies (Sigma, USA) were used. RSV was used as a negative (heterologous) control.

ших условиях (дорожки 4, зона, соответствующая электрофоретической подвижности более 250 kDa). В то же время эффективного связывания МКА с мономерной и олигомерной формой очищенного гексона в денатурирующих условиях не наблюдается. Следует отметить, что олигомеры очищенного гексона в денатурирующих условиях формируются за счет образования дисульфидных связей, чего не наблюдается в гексоне в составе АВ, что может объяснять отсутствие связывания этих олигомеров в вестерн блоттинге. Иными словами, полученные МКА связываются с пространственными эпитопами в составе олигомерной формы гексона АВ.

Таблица 3. Результаты тестирования МКА, выделенных из асцитной жидкости, методом непрямой иммунофлуоресценции

Table 3. Ascite-derived anti-adenovirus specific monoclonal antibody activity examined by indirect immunofluorescence

МКА* MAbs*	Типы АВ/AV types				Неинфицированная культура А 549 Uninfected A 549 cell line
	6	3	4	19	
4B7	++	+	+	+	-
6B12	++	++	++	++	-

Примечание. *Концентрация МКА 10 мкг/мл.

Note. *MAbs were used at concentration of 10 µg/ml.

МКА 2H7, 3F12, 4B7, 5D4, 5E11, 6B12, специфически реагирующие по результатам первичного скрининга с АВ различных типов, были переведены в асцитную форму. Активность МКА, выделенных из асцитной жидкости, была оценена методом ИФА с очищенным АВ 6 типа (рис. 5).

Наибольшей специфической активностью, определенной методом ИФА, обладали МКА 4B7 и 6B12 (титр антител составил 10⁻⁶), МКА 3F12 и 5E11 обладали меньшей активностью (титр антител составил 10⁻⁴), активность МКА 2H7 и 5D4 была слабовыраженной.

Активность МКА 4B7 и 6B12 в отношении различных типов АВ была также изучена методом ИИФЛ (табл. 3, рис. 6).

МКА 4B7 и 6B12 выявляли АВ 3, 4, 6 и 19 типов в инфицированных клетках при отсутствии неспецифических реакций, однако интенсивность взаимодействия при этом была различной. При использовании МКА 6B12 наблюдалась яркая гранулярная флуоресценция преимущественно ядерной локализации в отношении всех исследованных типов АВ. Активность МКА 4B7, определенная методом ИИФЛ, была менее выраженной, в отличие от высокой активности, показанной по результатам ИФА. Так, при исследовании ТО АВ 4 и 6 типов наблюдалась умеренная флуоресценция, а ТО АВ 3 и 19 типов флуоресценция была слабовыраженной. Это может быть связано с погружением вирусных эпитопов внутрь молекулы гексона в процессе формирования вторичных структур и их экранированием другими белковыми молекулами.

Перекрестная реактивность МКА 4B7 и 6B12 была изучена с помощью конкурентного ИФА. Экспериментальные серии пероксидазных конъюгатов МКА 4B7 (4B7-ПХК) и 6B12 (6B12-ПХК) использовали для исследования конкурентного ингибирования МКА.

При исследовании комбинаций МКА 4B7 с 4B7-ПХК и МКА 6B12 с 6B12-ПХК наблюдалось 90 и 93% ингибирование соответственно по сравнению с контролем (соответствующий пероксидазный конъюгат). При исследовании комбинации МКА 6B12 с 4B7-ПХК наблюдалось ингибирование на 16%. При исследовании

комбинации МКА 4В7 с 6В12-ПХК степень ингибирования достигала 79%. Вероятно, МКА 4В7 и 6В12 направлены к перекрывающимся пространственным эпитопам в составе гексона. Существенные различия в степени ингибирования при использовании разных комбинаций меченых и не меченых МКА могут быть объяснены более высокой авидностью к гексону МКА 4В7 по сравнению с МКА 6В12. В связи с этим МКА 4В7 быстрее специфически реагировали с антигенным эпитопом, препятствуя последующему связыванию с ним МКА 6В12.

Заключение

В настоящее время для получения МКА используется как гибридомная технология в практически неизменном виде с момента разработки ее авторами G. Köhler и S. Milstein [12], так и альтернативные методы, например, метод фагового дисплея [6]. МКА могут быть получены практически к любой молекуле белковой природы, углеводам, нуклеиновым кислотам и гаптенам, некоторые МКА обладают каталитической активностью [18], что делает потенциальный спектр применения МКА довольно широким.

МКА используются как для научных исследований, так и в медицинской практике. Одним из перспективных направлений является получение терапевтических МКА к возбудителям вирусных и бактериальных инфекций. Препараты на основе МКА успешно применяются при лечении некоторых видов рака (рак толстого кишечника, немелкоклеточный рак легких, глиобластома, метастазирующий рак почки) и аутоиммунных заболеваний (ревматоидный артрит, псориаз, болезнь Крона), а также для подавления иммунной системы после трансплантации органов [14].

В медицинской диагностике МКА являются обычным инструментом при проведении таких исследований как вестерн блоттинг, иммуногистохимия, иммуноцитохимия, ИФА, ИФЛ и проточный цитометрический анализ. Создание современных диагностических систем отечественного производства является од-

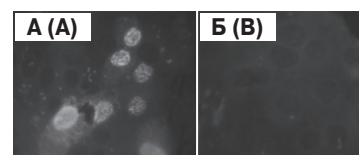


Рисунок 6. Характер специфической флуоресценции при использовании метода ИФЛ с применением МКА 6В12

Figure 6. Specific 6B12 monoclonal antibody-related fluorescent signal examined by indirect immunofluorescent analysis

Примечание. А — культура клеток А 549, зараженная АВ 6 типа, В — неинфицированная культура клеток А 549. Увеличение $\times 400$.

Note. А — А 549 cells infected with AV type 6; В — mock infected A 549 cells. Magnification $\times 400$.

ним из приоритетных направлений, обозначенных в Комплексной программе развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 г.

Полученные МКА специфичны к гексону АВ, который является общим антигеном для всех представителей обширного семейства *Adenoviridae*. Изучены их биологические и диагностические свойства. Специфическая активность новых МКА в отношении респираторных АВ исследована в различных иммунологических реакциях. Результаты свидетельствуют о перспективности использования новых МКА для конструирования современных диагностических тест-систем.

Благодарности

Авторы выражают глубокую и искреннюю благодарность Царевой Татьяне Радистовне и Сорокину Евгению Валентиновичу за неоценимую помощь в работе с гибридомами-продуцентами моноклональных антител, Эдварду Рэмзи за помощь в работе над текстом статьи.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Соглашение № 14.604.21.0180, уникальный идентификационный номер проекта RFMEFI60417X0180.

Список литературы/References

- Амосова И.В., Тимошичева Т.А., Егорова А.А., Мусаева Т.Д., Писарева М.М., Едер В.А., Львов Н.И. Генетическое разнообразие аденовирусов, циркулирующих среди военнослужащих Северо-Западного региона // Вопросы вирусологии. 2017. Т. 6, № 62. С. 283–287. [Amosova I.V., Timoshicheva T.A., Egorova A.A., Musaeva T.D., Pisareva M.M., Eder V.A., Lvov N.I. Genetic diversity of adenoviruses circulating among the military in the North-West region. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2017, vol. 62, no. 6, pp. 283–287. doi: 10.18821/0507-4088-2017-62-6-283-287 (In Russ.)]
- Амосова И.В., Тимошичева Т.А., Сверлова М.В., Бузицкая Ж.В., Егорова А.А., Львов Н.И. Использование микрокультурального иммуноферментного анализа и модифицированного метода иммунофлуоресценции для диагностики аденовирусной инфекции // Клиническая лабораторная диагностика. 2017. Т. 62, № 4. С. 230–235. [Amosova I.V., Timoshycheva T.A., Sverlova M.V., Buzitskaya J.V., Egorova A.A., Lvov N.I. The application of micro-cultural enzyme-linked

- immunosorbent assay of modified immunofluorescence technique for diagnostic of adenovirus infection. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2017, vol. 62, no. 4, pp. 230–235. doi: 10.18821/0869-2084-2017-62-4-230-235 (In Russ.)
3. Горностаева Ю.А., Романова Т.С. Актуальные вопросы профилактики респираторных инфекций // Медицинский совет. 2012. № 7. С. 98–103. [Gornostaeva Y.A., Romanova T.S. Current issues in prevention of respiratory infections. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*, 2012, no. 7, pp. 98–103. (In Russ.)]
 4. Яцышина С.Б., Агеева М.Р., Воробьева Н.С., Валдохина А.В., Елькина М.А., Горелов А.В., Малеев В.В., Покровский В.И. Аденовирусы в этиологической структуре острых респираторных вирусных инфекций в Москве в 2004–2014 гг. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2015. № 5. С. 50–57. [Yatsyshina S.B., Ageeva M.R., Vorobieva N.S., Valdokhina A.V., Elkina M.A., Gorelov A.V., Maleev V.V., Pokrovsky V.I. Adenoviruses in the etiological structure of acute respiratory viral infection in Moscow in 2004–2014. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2015, no. 5, pp. 50–57. (In Russ.)]
 5. Candiano G., Bruschi M., Musante L., Santucci L., Ghiggeri G.M., Carnemolla B., Orecchia P., Zardi L., Righetti P.G. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 2004, vol. 25, no. 9, pp. 1327–1333. doi: 10.1002/elps.200305844
 6. Chan C.E., Lim A.P., MacAry P.A., Hanson B.J. The role of phage display in therapeutic antibody discovery. *Int. Immunol.*, 2014, vol. 26, no. 12, pp. 649–657. doi: 10.1093/intimm/dxu082
 7. Döhner L., Dieckmann U. Antigenic composition of adenovirus hexons. *Acta Biol. Med. Ger.*, 1978, vol. 37, no. 11–12, pp. 1735–1740.
 8. Ebner K., Pinsker W., Lion T. Comparative sequence analysis of the hexon gene in the entire spectrum of human adenovirus serotypes: phylogenetic, taxonomic, and clinical implications. *J. Virol.*, 2005, vol. 79, no. 20, pp. 12635–12642. doi: 10.1128/JVI.79.20.12635-12642.2005
 9. Fortsas E., Petric M., Brown M. Electrophoretic migration of adenovirus hexon under non-denaturing conditions. *Virus Res.*, 1994, vol. 31, no. 1, pp. 57–65. doi: 10.1016/0168-1702(94)90071-X
 10. Irmen K.E., Kelleher J.J. Use of monoclonal antibodies for rapid diagnosis of respiratory viruses in a community hospital. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2000, vol. 7, no. 3, pp. 396–403. doi: 10.1128/CDLI.7.3.396-403.2000
 11. Khilko S.N., Kirasova M.A., Kiseleva E.K., Tikchonenko T.I. Comparison of adenoviral hexon polypeptides (monomers) and of native hexons (trimers) by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Acta Microbiol. Hung.*, 1990, vol. 37, no. 2, pp. 233–245.
 12. Köhler G., Milstein C. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur. J. Immunol.*, 1976, vol. 6, no. 7, pp. 511–519. doi: 10.1002/eji.1830060713
 13. Laemmli U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685. doi: 10.1038/227680a0
 14. Magalhaes L.G., Ferreira L.L.G., Andricopulo A.D. Recent advances and perspectives in cancer drug design. *An. Acad. Bras. Cienc.*, 2018, vol. 90, no. 1, suppl. 2, pp. 1233–1250. doi: 10.1590/0001-3765201820170823
 15. Målen H., Berven F.S., Fladmark K.E., Wiker H.G. Comprehensive analysis of exported proteins from Mycobacterium tuberculosis H37Rv. *Proteomics*, 2007, vol. 7, no. 10, pp. 1702–1718. doi: 10.1002/pmic.200600853
 16. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.*, 1974, vol. 22, no. 12, pp. 1084–1091. doi: 10.1177/22.12.1084
 17. Orvell C. Structural polypeptides of mumps virus. *J. Gen. Virol.*, 1978, vol. 41, no. 3, pp. 527–539. doi: 10.1099/0022-1317-41-3-527
 18. Pollack S.J., Jacobs J.W., Schultz P.G. Selective chemical catalysis by an antibody. *Science*, 1986, vol. 234, no. 4783, pp. 1570–1573. doi: 10.1126/science.3787262
 19. Walter J.M., Wunderink R.G. Severe respiratory viral infections: new evidence and changing paradigms. *Inf. Dis. Clin. North Am.*, 2017, vol. 31, no. 3, pp. 455–474. doi: 10.1016/j.idc.2017.05.004
 20. Zdanov K.V., Lvov N.I., Maltsev O.V., Peredelsky E.V., Pisareva M.M. Main aetiological features of acute respiratory viral diseases in young people of draft age and conscripts during the 2013–2014 epidemic season. *Int. Rev. Arm. Forc. Med. Serv.*, 2016, vol. 89, no. 2, pp. 58–63.

Авторы:

Тимошичева Т.А., младший научный сотрудник лаборатории биотехнологии диагностических препаратов ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Забродская Я.А., научный сотрудник лаборатории системной вирусологии ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия; младший научный сотрудник лаборатории биофизики макромолекул НИЦ «Курчатовский институт» — ПИЯФ, Санкт-Петербург, Россия;
Амосова И.В., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии диагностических препаратов ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Timoshicheva T.A., Junior Researcher, Biotechnology Laboratory of Diagnostic Products, Smorodintsev Research Institute of Influenza Ministry of Healthcare, St. Petersburg, Russian Federation;
Zabrodskaya Ya.A., Researcher, Laboratory of System Virology, Smorodintsev Research Institute of Influenza Ministry of Healthcare, St. Petersburg, Russian Federation; Junior Researcher, Laboratory of Macromolecule Biophysics, Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of NRC Kurchatov Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Amosova I.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Biotechnology Laboratory of Diagnostic Products, Smorodintsev Research Institute of Influenza Ministry of Healthcare, St. Petersburg, Russian Federation.

РАЗЛИЧИЯ В АМИНОКИСЛОТНОМ СОСТАВЕ АНТИГЕННЫХ ЭПИТОПОВ БЕЛКА VP7 РОССИЙСКИХ РОТАВИРУСОВ С ГЕНОТИПОМ G9 И ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ ROTATEQ, ROTAVAC И ROTARIX

О.В. Морозова^{1,2}, Т.А. Сашина¹, Н.В. Епифанова¹, Н.А. Новикова^{1,2}

¹ ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия

² ФГБОУ Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

Резюме. *Введение.* Ротавирусы группы А (РВА) с генотипом G9P[8] являются распространенной причиной острого гастроэнтерита среди детей в России. На территории Нижнего Новгорода доля этого генотипа в типовой структуре ротавируса в сезон 2016–2017 гг. достигла 63,1%. В мире для специфической профилактики ротавирусной инфекции широко применяют две вакцины (RotaTeq и Rotarix). Кроме этого, на базе штамма G9P[8] разработана индийская вакцина Rotavac, которая применяется на региональном уровне. Поскольку штаммы ротавируса, входящие в состав вакцин, были изолированы более 30 лет назад, представляет научно-практический интерес проведение филогенетического анализа и сравнительного анализа антигенных эпитопов российских и вакцинных штаммов. В настоящем исследовании впервые проведен сравнительный анализ аминокислотного состава В- и Т-клеточных эпитопов белка VP7 ротавируса с генотипом G9 российских и вакцинных штаммов RotaTeq, Rotarix и Rotavac. *Материалы и методы.* Материалом для исследования служили нуклеотидные и аминокислотные последовательности гена VP7 РВА с генотипом G9. Ротавирусы были выявлены у детей, госпитализированных с острым гастроэнтеритом в инфекционный стационар Нижнего Новгорода в период 2011–2016 гг. *Результаты.* Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена VP7 показал, что нижегородские штаммы принадлежат аллелю G9-III. На основе выведенных аминокислотных последовательностей VP7 проанализировано 3 В-клеточных эпитопа (7–1a, 7–1b и 7–2) и 2 Т-клеточных эпитопа (16–28 а.о. и 40–52 а.о.). Наименьшее количество замен было показано для вакцины RotaTeq (0–3 а.о. на эпитоп), зарегистрированной в России. Аналогично (0–3 а.о. замены на эпитоп), было показано при сравнении нижегородских изолятов РВА с вакцинным штаммом в составе Rotavac. Наибольшее количество аминокислотных различий обнаружено между вакцинным штаммом Rotarix и нижегородскими изолятами РВА (3–10 а.о. на эпитоп). *Заключение.* В настоящей работе проведен филогенетический анализ, а также выявлены различия в аминокислотном составе антигенных сайтов белка VP7 РВА, между нижегородскими ротавирусами с генотипом G9 и штаммами в составе вакцин RotaTeq, Rotavac и Rotarix. Накопление мутаций в антигенных эпитопах может способствовать ускользанию вируса от иммунного ответа. В связи

Адрес для переписки:

Морозова Ольга Владимировна
603950, Россия, Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71,
ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной.
Тел.: 8 (831) 469-79-11 (служебн.); 8 (952) 458-12-71 (моб.).
E-mail: olga.morozova.bsc@gmail.com

Contacts:

Olga V. Morozova
603950, Russian Federation, Nizhny Novgorod,
Malaya Yamskaya str., 71, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod
Research Institute of Epidemiology and Microbiology.
Phone: +7 (831) 469-79-11 (office); +7 (952) 458-12-71 (mobile).
E-mail: olga.morozova.bsc@gmail.com

Библиографическое описание:

Морозова О.В., Сашина Т.А., Епифанова Н.В., Новикова Н.А. Различия в аминокислотном составе антигенных эпитопов белка VP7 российских ротавирусов с генотипом G9 и вакцинных штаммов RotaTeq, Rotavac и Rotarix // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 1. С. 57–66.
doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-57-66

Citation:

Morozova O.V., Sashina T.A., Epifanova N.V., Novikova N.A. Differences in the amino acid composition of the antigen epitopes of the VP7 protein of Russian rotaviruses with the G9 genotype and the vaccine strains RotaTeq, Rotavac, and Rotarix // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 57–66. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-57-66

с этим, для оценки возможного воздействия вакцин на типовую структуру популяции РВА и контроля за появлением измененных антигенных вариантов необходим постоянный молекулярный мониторинг циркулирующих РВА.

Ключевые слова: российские ротавирусы, G9, вакцины, антигенные эпитопы.

DIFFERENCES IN THE AMINO ACID COMPOSITION OF THE ANTIGEN EPITOPES OF THE VP7 PROTEIN OF RUSSIAN ROTAVIRUSES WITH THE G9 GENOTYPE AND THE VACCINE STRAINS ROTATEQ, ROTAVAC, AND ROTARIX

Morozova O.V.^{a,b}, Sashina T.A.^a, Epifanova N.V.^a, Novikova N.A.^{a,b}

^a I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

^b Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Abstract. Introduction. Rotaviruses of group A (RVA) with genotype G9P[8] are a common cause of acute gastroenteritis in children in Russia. In Nizhny Novgorod, the part of G9P[8] among all RVA strains reached 63.1% during 2016–2017 epidemic season. Two live rotavirus vaccines, RotaTeq and Rotarix have been successfully introduced into the national immunization programs worldwide. In addition, the Indian vaccine Rotavac, based on the strain with G9P[8] genotype, is used on a regional level. The parent strains for all mentioned vaccines were isolated more than 30 years ago. There is no data about phylogenetic analysis and comparative analysis of antigenic epitopes of Russian G9P[8] wild-type isolates and vaccine strains. In the present study, for the first time, we provide a comparative phylogenetic analysis and research of the amino acid composition of the B- and T-cell epitopes of the VP7 protein between Russian rotaviruses with the G9 genotype and the vaccine strains in RotaTeq, Rotarix and Rotavac composition. Materials and methods. The nucleotide and amino acid sequences of the VP7 gene of RVA with genotype G9 were studied. The rotaviruses had been previously isolated from children hospitalized with acute gastroenteritis in the infectious hospital in Nizhny Novgorod during 2011–2016. Results. A phylogenetic analysis of the nucleotide sequences of the VP7 gene showed that the Nizhny Novgorod strains belong to the G9-III allele. Based on the amino acid sequences VP7, three B-cell epitopes (7–1a, 7–1b and 7–2) and two T-cell epitopes (16–28 aa and 40–52 aa) were analyzed. The smallest number of substitutions was found in the RotaTeq vaccine registered in Russia: from 0 to 3 aa differences at the epitope. The same (from 0 to 3 aa differences at the epitope) was found between the wild-type strains RVA and the Rotavac vaccine. The largest number of amino acid differences was found between the vaccine strain Rotarix and the Nizhny Novgorod G9 strains (from 3 to 10 aa at the epitope). Conclusion. In the present work, based on nucleotide sequences VP7 gene, we provide phylogenetic and comparative analyses of the amino acid composition of antigenic epitopes of G9 RVA isolated in Russia vs rotavirus strains in vaccines RotaTeq, Rotavac and Rotarix. The accumulation of mutations in antigenic epitopes can help the virus to escape the immune response. Continuous molecular monitoring of wild-type RVA strains is necessary for estimation of the possible impact of vaccines on the genotype diversity of the rotavirus population in the wild and to monitor the emergence of novel antigenic variants.

Key words: russian rotaviruses, G9, vaccines, antigenic epitopes.

Введение

Ротавирусы группы А (РВА), характеризующиеся уникальным антигенным и генетическим разнообразием, являются одной из основных причин острого гастроэнтерита у детей первых лет жизни. В связи с тяжелым бременем ротавирусной инфекции (РВИ), ВОЗ рекомендует введение массовой вакцинации во всех странах мира. В настоящее время вакцинация против РВА введена в национальный календарь прививок в 93 странах по всему миру [20]. Широко применяют две вакцины: реассортантную пентавалентную вакцину RotaTeq® (RV5) (Merck&Co. Inc., WestPoint, PA, США), созданную на основе бычьего ротавируса, содержащего в своем составе гены VP7 и VP4 штаммов ротавируса человека генотипов G1, G2, G3, G4 и P[8] соответ-

ственно [30] и моновалентную вакцину Rotarix (RV1) (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Бельгия), представляющую собой аттенуированный штамм генотипа G1P[8] ротавируса человека [23]. Кроме этого, существуют вакцины, которые используют на региональном уровне: Rotavin-M1, разработанная на основе штамма G1P[8] ротавируса человека и лицензированная для использования во Вьетнаме с 2007 г.; LLR (Lanzhou lamb rotavirus) — созданная на основе G10P[12] ротавируса ягнят и применяемая в Китае с 2000 г. [9, 12]; Rotavac, лицензированная в Индии и основанная на аттенуированном штамме 116E генотипа С9P[8] изолированном от ребенка в 1985 г. [32].

В России зарегистрирована ротавирусная вакцина RotaTeq, применение которой регламентировано по эпидемическим показани-

ям [Приказ Минздрава России от 21.03.2014 №125н]. В настоящее время в ряде регионов РФ начата реализация пилотных проектов по вакцинопрофилактике РВИ с использованием вакцины RotaTeq: Москва и Московская область, Тверь, Тюмень, Красноярск, Краснодар, Смоленск и др. Сравнительный анализ заболеваемости РВИ у детей 1–2 года в Тюменской области в детских поликлиниках, где реализовывалась программа профилактики, показал нисходящий тренд в период сезонного подъема инфекции, а также высокий уровень безопасности и эффективности программы иммунизации вакциной RotaTeq [4].

По данным наблюдений, проводимых референс-центром по мониторингу за возбудителями острых кишечных инфекций в 11 субъектах Российской Федерации, совпадение выявленных генотипов ротавирусов с включенными в пятивалентную вакцину RotaTeq штаммами позволяет ожидать снижения уровня заболеваемости при внедрении массовой иммунизации детей раннего возраста против РВИ [5]. Однако на данном этапе, охват вакцинацией против ротавирусной инфекции, проводимой по эпидемиологическим показаниям, не может оказать влияния на суммарные показатели заболеваемости в целом по стране.

В настоящее время в мире эпидемиологически значимыми считаются шесть G[P]-типов ротавируса: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] и G12P[8] [16, 25]. Ротавирусы группы А данных генотипов, в том числе и G9, распространены и на территории России. Впервые РВА генотипа G9 в комбинации с генотипом P[6] были обнаружены у новорожденных г. Омска в 2002 г. После этого было показано, что в Западной Сибири присутствуют штаммы генотипа G9P[8] [3]. В европейской части России (Московская область) ротавирусы G9P[8] были впервые идентифицированы в 2009 г. [29], а в 2011–2013 гг. штаммы генотипа G9P[8] были идентифицированы в восьми городах России, их средняя доля составляла 4,9% [1]. В сезон 2015–2016 гг. в Нижнем Новгороде РВА G9P[8], генетически родственные штаммам, изолированным на территории Турции, заняли доминирующее положение (45,9%) [26].

Молекулярные механизмы, лежащие в основе индукции иммунного ответа на РВИ, остаются до конца неизвестными. Принято считать, что формирование иммунного ответа, в том числе гетеротипического, опосредуют антитела против белков наружного капсида VP7 и VP4 [19]. Основной гликопротеин наружного капсида ротавируса VP7 несет на своей поверхности мишени для нейтрализующих антител [7, 13, 31]. Замены в аминокислотном составе эпитопов могут влиять на эффективность

как гомотипических, так и гетеротипических антител. Потенциально массовая вакцинация может увеличить иммунный прессинг на ротавирусную популяцию, приводя к повышению мутационной изменчивости антигенных детерминант. Мониторинг аминокислотных последовательностей в регионах, ответственных за иммунный ответ, позволит оценить скорость накопления мутаций под воздействием вакцинации, а также послужит базой для оценки в случае ее недостаточной эффективности. Исследования, посвященные сравнительной молекулярной характеристике вакцинных и современных российских штаммов с генотипом G9, отсутствуют.

В данной работе представлены результаты филогенетического анализа на основе нуклеотидных последовательностей гена VP7 штаммов РВА генотипа G9, изолированных на территории Нижнего Новгорода в 2011–2016 гг., представленных в GenBank нуклеотидных последовательностей ротавирусов, выделенных на других территориях России и штаммов, входящих в состав вакцин RotaTeq, Rotavac и Rotarix. Также проведено сравнение аминокислотного состава известных В- и Т-клеточных эпитопов вакцинных и российских штаммов.

Материалы и методы

Исследуемый материал и определение нуклеотидной последовательности. Проанализированы 12 нуклеотидных последовательностей гена VP7 с генотипом G9. Исследованные последовательности принадлежали РВА, которые были изолированы от детей, госпитализированных в инфекционный стационар Нижнего Новгорода с диагнозом острая кишечная инфекция в период с 2011 по 2016 гг.

Для проведения ОТ-ПЦР РНК ротавирусов экстрагировали из фекалий стандартным методом, с использованием набора для экстракции нуклеиновых кислот «РИБО-сорб», кДНК синтезировали с помощью комплекта реагентов «Реверта» (Амплисенс, ФБУН ЦНИИЭ, Москва), как было описано ранее [2, 26]. Нуклеотидные последовательности гена VP7 устанавливали в автоматическом режиме с использованием генетического анализатора Beckman Coulter SEQ8000 и набора реагентов DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter, США), согласно рекомендациям производителя. Используемые в данной работе последовательности нижегородских штаммов РВА представлены в базе данных GenBank под номерами: KC689358–KC689361, KX545306–KX545308, KX545325, KX545327, KY807549, KY807550.

В исследуемую выборку вошли нуклеотидные последовательности гена VP7 с геноти-

пом G9 РВА, изолированных на территории Новосибирска, Омска, Смоленска и Москвы (KT000116, KT000119, KT000120, KT000112, KT000117, KC762222, GU390449, KF648937, KF648938, JX841179, JX841178, KC713895, FJ529390), а также штаммы в составе вакцин RotaTeq, Rotarix и Rotavac (JN849114, FJ361209, GU565057, GU565046, GU565090, GU565079, GU56506).

Анализ последовательностей. Обработку и выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли с применением программного обеспечения MEGA5 [27]. Филогенетический анализ проведен с использованием пакета программ BEAST [11]. Процесс замещения нуклеотидов оценивали с помощью модели Хасегава–Кишино–Яно (HKY, Hasegawa–Kishino–Yano). Скорость эволюции измеряли на базе нестрогих (свободных) логнормальных молекулярных часов. Для достижения значений эффективного размера выборки (ESS) 200 длина цепи Маркова (MCMC, Markov chain Monte Carlo) составила 50 млн шагов.

Результаты

Филогенетический анализ. Все РВА, изолированные на территории Нижнего Новгорода с генотипом G9 гена VP7 относятся к линии G9-III (рис. 1). На филогенетическом древе нижегородские образцы формируют два кластера — G9-IIIa и G9-IIIb, уровень различий между которыми составил 3–7%. Различия между нуклеотидными последовательностями РВА линии G9-III и линии G9-II, которая представлена штаммом 116E, входящим в вакцину Rotavac, составило 12%. Последовательности гена VP7 нижегородских изолятов с генотипом G9 и РВА в составе вакцин RotaTeq (G1, G2, G3, G4, G6) и Rotarix (G1) отличались на 24–26%. Скорость накопления мутаций составила $1.627E-3$ нуклеотидов/на сайт/в год.

В целом филогенетический анализ показал разнообразие линий РВА с генотипом G9, циркулирующих в России. На филогенетическом древе видна еще одна отдельная группа G9-IIIc, которую формируют штаммы, изолированные в Смоленске и Москве в 2012–2013 гг. Отличие от нижегородских ротавирусов составило 7–9%.

Анализ нейтрализующих эпитопов. Наличие аминокислотных различий между вакцинными штаммами ротавируса и штаммами, изолированными на территории Нижнего Новгорода, установлено во всех трех нейтрализующих эпитопах 7–1a, 7–1b и 7–2 (табл. 1). Однако количество аминокислотных замен не одинаково для разных вакцин. По одному аминокислотному различию между современными и вакцинными

штаммами RotaTeq показано в регионах 7–1a и 7–1b. Низкий уровень аминокислотных замен между российскими штаммами G9 и вакциной RotaTeq достигается многокомпонентностью штаммов, входящих в состав вакцины и, как следствие, вариативным аминокислотным составом в области нейтрализующих эпитопов. По два аминокислотных различия в эпитопах 7–1a и 7–2 показано для штамма 116E, входящего в состав вакцины Rotavac. Больше всего различий показано между нижегородскими штаммами и вакциной Rotarix: пять замен в регионе 7–1a, четыре — в 7–1b и четыре — в 7–2.

Анализ линейных эпитопов. Одна и две аминокислотных замены показаны между современными и вакцинными штаммами RotaTeq и Rotavac соответственно. Три из 13 аминокислот линейного эпитопа 16–28 а.о. отличались между вакцинным штаммом Rotarix и ротавирусами с генотипом G9, изолированными в Нижнем Новгороде (табл. 2). Линейный эпитоп 40–52 а.о. содержит по 3 аминокислотных различия с RotaTeq и Rotavac и 10 аминокислотных различий между вакциной Rotarix и российскими изолятами.

Обсуждение

Эпидемиологические наблюдения за разнообразием генотипов РВА показывают, что долевое распределение G[P]-типов может варьировать в разных географических регионах. В то же время более 90% ротавирусов, вызывающих заболевание у людей, имеют генотипы G1, G2, G3, G4, G9, G12, ассоциированные с генотипом P[8]. В Нижнем Новгороде РВА с генотипом G9 заняли доминирующее положение. Их доля в генотиповой структуре нижегородской популяции ротавируса составила 45,9% в сезон 2015–2016 гг. [26] и увеличилась до 63,1% в сезон 2016–2017 гг. (данные не представлены). Штаммы для вакцин RotaTeq, Rotavac и Rotarix были выделены более 30 лет назад. Представляло научно-практический интерес установить, насколько вакцинные штаммы отличаются от современных ротавирусов, с точки зрения аллелей генов, входящих в их состав, и аминокислотного состава антигенных сайтов. Следует сказать, что широко применяемые во всем мире вакцины RotaTeq, Rotarix и индийская вакцина Rotavac показали хорошие результаты против развития тяжелых случаев гастроэнтерита, вызванного РВА [8, 21, 28].

К настоящему времени известны 3 аллеля гена VP7 с генотипом G9. Линии G9-I и G9-II (вакцинный штамм E116 в составе Rotavac) были выделены в 1980-х гг., когда РВА с генотипом G9 впервые были изолированы от людей. Ротавирусы, проанализированные в данном

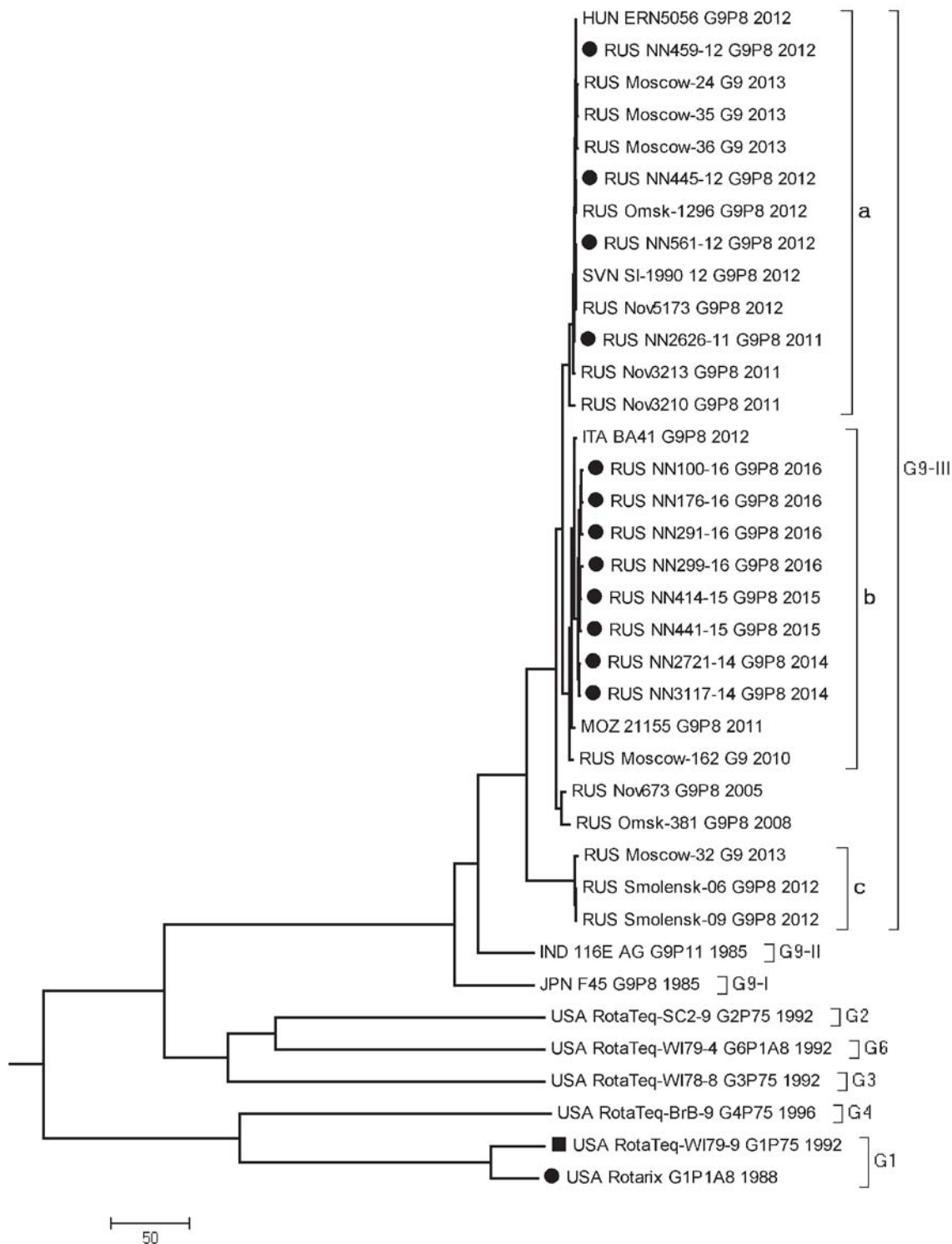


Рисунок. Байесовское филогенетическое дерево MCC (Maximum clade credibility), сконструированное на основе нуклеотидных последовательностей гена VP7

Figure. Bayesian MCC (Maximum clade credibility) tree based on nucleotide sequences of VP7 gene

Примечание. Нижегородские штаммы отмечены знаком (●), вакцинные штаммы RotaTeq (■), Rotavac (◆), Rotarix (▲). Масштабная шкала отражает время в годах.

Note. Nizhny Novgorod sequences are marked with a circle (●). RotaTeq, Rotavac, and Rotarix sequences are indicated with square (■), rhombus (◆) and triangle (▲), respectively. The scale bar represents time in years.

Таблица 1. Сравнение аминокислотных последовательностей нейтрализующих сайтов гена VP7 штаммов G9 генотипа, изолированных на территории России, и вакцинных штаммов в составе RotaTeq, Rotavac и Rotarix

Table 1. Alignment of antigenic residues in VP7 of the strains contained in RotaTeq, Rotavac and Rotarix and rotavirus strains with G9 genotype that isolated in Russia

Штамм Strain	7-1a										7-1b					7-2														
	87	91	94	96	97	98	99	100	104	123	125	129	130	291	201	211	212	213	238	242	143	145	146	147	148	190	217	221	264	
RotaTeq G1	T	T	N	G	D	W	K	D	Q	S	V	V	D	K	Q	N	V	D	N	T	K	D	Q	S	L	S	M	N	G	
RotaTeq G2	A	N	S	D	E	W	E	N	Q	D	T	M	N	K	Q	D	V	S	N	S	K	D	N	T	S	D	I	S	G	
RotaTeq G3	T	T	N	N	S	W	K	D	Q	D	A	V	D	K	Q	D	A	N	K	D	K	D	A	T	L	S	E	A	G	
RotaTeq G4	S	T	S	T	E	W	K	D	Q	D	L	I	D	K	Q	D	T	A	D	T	K	A	S	G	E	S	T	S	G	
RotaTeq G6	V	N	A	T	E	W	K	D	Q	D	A	V	E	K	Q	D	P	D	N	A	K	D	S	T	Q	S	T	T	G	
116E G9	I	T	G	T	E	W	K	G	Q	D	A	I	D	K	Q	N	T	A	D	N	K	N	S	T	L	S	E	N	G	
Rotarix G1	T	T	N	G	E	W	K	D	Q	S	V	V	D	K	Q	N	V	D	N	T	K	D	Q	N	L	S	M	N	G	
Российские G9 Russian G9	T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	Q	N	T	A	D	N	K	D	S	T/P	L	S	E	S	G	
RV5																				●										
116E	◆							◆														◆							◆	
RV1			▲							▲	▲	▲					▲	▲	▲	▲			▲	▲			▲	▲	▲	

Примечание. Аминокислотные различия с вакциной RotaTeq показаны (●), Rotavac (◆), Rotarix (▲).
Note. Amino acid changes are indicated by a circle (●) for RotaTeq, rhombus (◆) for Rotavac and triangle (▲) for Rotarix.

исследовании, относятся к линии G9-III, как и подавляющее большинство современных РВА этого генотипа. Нижегородские штаммы с генотипом G9 гена VP7 образовали два кластера с уровнем различий нуклеотидных последовательностей 3–7%. Один кластер включал в себя штаммы G9, впервые обнаруженные на территории Нижнего Новгорода в 2011 г. [2]. Также в него вошли ротавирусы, изолированные на территории Москвы, Омска и Новосибирска в 2011–2013 гг. Второй кластер включает штаммы, доминировавшие в Нижнем Новгороде в эпидемический сезон 2015–2016 гг. и близкородственные турецким штаммам [26]. Стоит отметить, что филогенетические различия не отразились на аминокислотном составе антигенных эпитопов. Скорость накопления мутаций составила 1.627E-3 нуклеотидов на сайт в год. Схожий уровень мутаций (1.87E-3) был показан для выборки G9 штаммов РВА, изолированных по всему миру [16].

Существует ряд исследований, посвященных анализу аминокислотного состава антигенных эпитопов современных штаммов РВА, выделенных от детей (в том числе в России), и вакцинных штаммов в составе RotaTeq и Rotarix [6, 15, 17, 18, 33]. Во всех исследованиях установлено наличие аминокислотных различий в антигенных эпитопах, однако остается неясным, насколько они могут отражаться на эффективности вакцинации. В нашем исследовании анализ нейтрализующих эпитопов 7-1a, 7-1b и 7-2 показал две аминокислотные замены (в эпитопах 7-1a и 7-1b) для зарегистрированной в России вакцины RotaTeq, что связано с генотиповым разнообразием штаммов в ее составе. Четыре аминокислотных замены показано для штамма 116E в составе индийской вакцины Rotavac, по две — в регионах 7-1a и 7-2. Нижегородские РВА генотипа G9 и штамм RIX4414, входящий в состав вакцины Rotarix, различались 13-ю из 29-ти аминокислот.

Ротавирусная инфекция и иммунизация индуцируют сильный специфический ответ на белок VP7. Антигенные регионы 7-1 и 7-2 вместе покрывают большую часть наружной поверхности VP7, приводя к тому, что у разных серотипов отсутствуют консервативные участки в этой области [7]. Ранее в нейтрализующих эпитопах белка VP7 ротавирусов было показано наличие аминокислотных замен, приводящих к избеганию иммунного ответа (escape-mutation). Для РВА с генотипом G9 это 5 позиций под номерами 91, 94, 96, 213 и 242 [14]. Аминокислоты 91, 94 и 96 находятся в эпитопе 7-1a, позиции 213 и 242 расположены в эпитопе 7-2b. Вакцинные штаммы в составе RotaTeq имеют замены в позициях 94 и 242. Индийская вакцина Rotavac в указанных пяти позици-

ях не отличалась от нижегородских изолятов с генотипом G9. Вакцинный штамм в составе Rotarix различается с российскими штаммами по четырем аминокислотам: 94, 96, 213 и 242.

Следует отметить особенности российских штаммов PBA, составивших группу G9-IIIc. Изоляты, входящие в этот кластер, имеют аминокислотные остатки D100 в линейном эпитопе 7–1a и L44 в Т-клеточном эпитопе (40–52 а.о.), аналогично вакцинам RotaTeq и Rotarix.

На территории Бельгии специфическая профилактика ротавирусной инфекции вакцинами RotaTeq и Rotarix включена в национальный календарь с 2007 г. Анализ антигенных сайтов белка VP7 штаммов, изолированных в Бельгии в 2008–2009 гг., и штаммов RotaTeq и Rotarix показал наличие замен [33], которые аналогичны заменам а.о. в сайтах VP7 PBA, изолированных в Нижнем Новгороде в 2011–2016 гг. При этом в Бельгии была показана высокая эффективность вакцинации с существенным снижением тяжелых случаев ротавирусного гастроэнтерита [24].

Клеточный иммунный ответ играет важную роль в контроле и элиминации вирусной инфекции. Роль Т-клеток в формировании протективного иммунитета против РВИ до конца не изучена. Ряд исследований показывает, что единичные аминокислотные различия в Т-клеточных эпитопах могут привести к невозможности распознавания эпитопа специфическими Т-клонами [22]. Для пентавалентной вакцины RotaTeq показано наличие одной и трех замен в линейных эпитопах 16–28 и 40–52 а.о. соответственно. Две и три аминокислотных замены соответственно были обнаружены между современными штаммами G9 и вакцинным штаммом 116E в составе вакцины Rotavac. Анализ линейных эпитопов белка VP7 между штаммами PBA с генотипом G9, изолированными на территории России, и вакцинным штаммом Rotarix показал наличие трех аминокислотных различий в регионе 16–28 а.о. и 10 различий в регионе 40–52 а.о. Значимость и динамику мутаций линейных эпитопов предстоит выяснить в дальнейшем.

В настоящее время отсутствуют данные, позволяющие оценить последствия аминокислотных замен в антигенных эпитопах VP7 PBA с генотипом G9 на формирование протективного иммунитета. Белок VP7 ротавируса несет на своей поверхности как серотип-специфические сайты, так и участки перекрестной нейтрализации. Одна из широко применяемых во всем мире вакцин RotaTeq достигает своей эффективности в условиях циркуляции ротавирусов разных генотипов предположительно благодаря разнообразию экспрессируемых антигенов. Как показало наше исследование, даже не имея в своем составе компонента с геноти-

Таблица 2. Сравнение аминокислотных последовательностей линейных эпитопов гена VP7 штаммов G9 генотипа, изолированных на территории России, и вакцинных штаммов в составе Rotarix, RotaTeq и Rotavac

Table 2. Alignment of antigenic residues in linear antigen epitopes in VP7 of the strains contained in RotaTeq, Rotavac and Rotarix and G9 strains circulated in Russia

Штамм Strain	Т-клеточный эпитоп 16–28 а.о. (Wei et al., 2009) T-cell epitope 16–28 aa (Wei et al., 2009)										Т-клеточный эпитоп 40–52 а.о. (Honeyman et al., 2010) T-cell epitope 40–52 aa (Honeyman et al., 2010)															
	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
RotaTeq G1	I	I	L	L	N	Y	I	L	K	S	V	T	R	I	T	V	A	L	F	A	L	T	R	A	Q	N
RotaTeq G2	I	I	L	L	N	Y	I	L	K	T	I	T	N	V	I	V	L	I	S	P	F	V	R	T	Q	N
RotaTeq G3	V	I	L	L	N	Y	V	L	K	S	L	T	R	I	I	V	I	L	S	P	L	L	N	A	Q	N
RotaTeq G4	F	V	L	V	S	Y	I	L	K	T	M	I	K	V	I	V	V	L	S	V	L	S	N	A	Q	N
RotaTeq G6	I	T	L	L	N	Y	I	L	K	S	I	T	R	M	V	V	I	L	A	T	I	I	N	A	Q	N
116E G9	I	I	L	L	N	Y	I	L	K	S	V	T	S	I	I	V	V	V	S	P	F	V	K	Q	N	
Rotarix G1	I	I	L	L	N	Y	I	L	K	S	V	T	R	I	Y	V	A	L	F	A	L	T	R	A	Q	N
Российские G9 Russian G9	I	V	L	L	N	Y	I	L	K	S	L	T	S	L	I	V	I	T/A/L	S	P	F	V	K	T	Q	N
RV5																		●								
116E		◆									◆						◆									
RV1		▲									▲				▲		▲		▲		▲		▲			

Примечание. Аминокислотные различия с вакциной RotaTeq показаны (●), Rotavac (◆), Rotarix (▲).

Note. Amino acid changes are indicated by a circle (●) for RotaTeq, rhombus (◆) for Rotavac and triangle (▲) for Rotarix.

пом G9, RotaTeq имеет наименьшее количество аминокислотных различий в антигенных эпитопах VP7 между вакцинными штаммами и современными G9 штаммами РВА, выделенными на территории России. Вакцина Rotavac зарегистрирована только на территории Индии, в клинических испытаниях она была признана безопасной и эффективной. Сравнительный анализ антигенных эпитопов VP7 нижегородских штаммов с генотипом G9 и моновалентной вакцины Rotarix показал наличие относительно большого количества аминокислотных замен. Однако делать выводы на этом основании о неэффективности этой вакцины не представляется возможным, поскольку исследования, проведенные ранее, показывают формирование гетеротипического иммунного ответа при вакцинации Rotarix [10].

В настоящее время долгосрочный эффект влияния вакцинации на типовую структуру популяции ротавируса остается непонятен. Возможно, результаты анализа изменений в антигенных эпитопах и данные по эффективности вакцин на территории, где эти штаммы были изолированы, со временем помогут выявить аминокислотные замены, ключевые для отклонения от иммунного ответа.

Заключение

В настоящем исследовании на основе гена VP7, описаны филогенетические и антигенные различия между ротавирусами генотипа G9, изолированными на территории Нижнего Новгорода и других городов России, и вакцинными штаммами в составе RotaTeq, Rotavac и Rotarix. На территории России в период с 2011 по 2016 гг. показана циркуляция как минимум трех вариантов РВА G9P[8] филогенетической линии III (IIIa, IIIb, IIIc) с уровнем различия до 9%. Установлено наличие аминокислотных замен в антигенных сайтах нижегородских штаммов РВА G9P[8] в сравнении с вакцинными штаммами. Применение вакцин против ротавируса может способствовать увеличению скорости накопления мутаций, затрагивающих области антигенных сайтов, что в свою очередь может способствовать ускользанию вируса от иммунного ответа. В связи с этим, постоянный молекулярный мониторинг штаммов РВА и анализ их генотиповой и антигенной изменчивости имеет научно-практическое значение для теоретической оценки эффективности применения вакцинации против РВИ и влияния на типовую структуру ротавирусной популяции.

Список литературы/References

1. Бахтояров Г.Н., Киселев И.С., Зверев В.В., Файзулов Е.Б. Оценка эффективности применения мультиплексной ПЦР в режиме реального времени для генотипирования ротавирусов группы А // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2014. № 4. С. 43–49. [Bakhtoyarov G.N., Kiselev I.S., Zverev V.V., Faizuloev E.B. Evaluation of real-time multiplex PCR effectiveness for group A rotavirus genotyping. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2014, no. 4, pp. 43–49. (In Russ.)]
2. Епифанова Н.В., Морозова О.В., Сашина Т.А., Новикова Н.А. Характеристика ротавируса генотипа G9, выявленного в Нижнем Новгороде в 2011–2012 годах // Медицинский алфавит. 2013. Т. 4, № 24. С. 20–26. [Epifanova N.V., Morozova O.V., Sashina T.A., Novikova N.A. Characteristics of rotavirus with G9-genotype identified in Nizhny Novgorod during years 2011–2012. *Meditinskiy alfavit = Medical Alphabet*, 2013, vol. 4, no. 24, pp. 20–26. (In Russ.)]
3. Жираковская Е.В., Аксанова Р.Х., Горбунова М.Г., Тикун А.Ю., Курильщикова А.М., Соколов С.Н., Нетесов С.В., Тикун Н.В. Генетическое разнообразие изолятов ротавирусов группы А, выявленных в Западной Сибири в 2007–2011 гг. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2012. № 4. С. 33–41. [Zhirakovskaya E.V., Tikunov A.Y., Kurilshchikova A.M., Tikunova N.V., Aksanova R.K., Sokolov S.N., Netesov S.V., Gorbunova M.G. Genetic diversity of group A rotavirus isolates found in Western Siberia in 2007–2011. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 2012, vol. 27, no. 4, pp. 174–183. (In Russ.)]
4. Рычкова О.А., Казакевич Н.В., Дубинина О.А., Шарух Г.В., Курбатская М.А., Иванова Г.Н., Подколзин А.Т., Суглобова С.Н., Сенникова Н.П., Лылова Т.П., Куличенко М.П. Профилактика ротавирусной инфекции: путь расширения региональной программы вакцинации Тюменской области // Фарматека. 2016. № 11. С. 106–111. [Rychkova O.A., Kazakevich N.V., Dubinina O.A., Sharukho G.V., Kurbatsaya M.A., Ivanova G.N., Podkolzin A.T., Suglobova S.N., Sennikova N.P., Lylova T.P., Kulichenko M.P. Prevention of rotavirus infection: the way of expansion of the regional vaccination program in Tyumen region. *Farmateka = Pharmateca*, 2016, no. 11, pp. 106–111. (In Russ.)]
5. Харит С.М., Бехтерева М.К., Лобзин Ю.В., Рудакова А.В., Подколзин А.Т., Тикун Н.В. Оценка бремени ротавирусных гастроэнтеритов как обоснование необходимости плановой вакцинации // Медицинский совет. 2017. № 4. С. 73–78. [Kharit S.M., Bekhtereva M.K., Lobzin J.V., Rudakova A.V., Podkolzin A.T., Tikunova N.V. The burden of rotavirus gastroenteritis, as the rationale for routine vaccination. *Meditinskiy sovet = Medical Council*, 2017, no. 4, pp. 73–78. (In Russ.)]
6. Abdel-Moneim A.S., Al-Malky M.I., Alsulaimani A.A., Abuelsaad A.S., Mohamed I., Ismail A.K. Sequence diversity of VP4 and VP7 genes of human rotavirus strains in Saudi Arabia. *Foodborne Pathog. Dis.*, 2015, vol. 12, no. 12, pp. 937–944. doi: 10.1089/fpd.2015.1990
7. Aoki S.T., Settembre E.C., Trask S.D., Greenberg H.B., Harrison S.C., Dormitzer P.R. Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab. *Science*, 2009, vol. 12, no. 324 (5933), pp. 1444–1447. doi: 10.1126/science.1170481
8. Bhandari N., Rongsen-Chandola T., Bavdekar A., John J., Antony K., Taneja S., Goyal N., Kawade A., Kang G., Rathore S.S., Juvekar S., Muliylil J., Arya A., Shaikh H., Abraham V., Vrati S., Proschan M., Kohberger R., Thiry G., Glass R., Greenberg H.B.,

- Curlin G., Mohan K., Harshavardhan G.V., Prasad S., Rao T.S., Boslego J., Bhan M.K., India Rotavirus Vaccine Group. Efficacy of a monovalent human-bovine (116E) rotavirus vaccine in Indian infants: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, 2014, vol. 383 (9935), no. 21, pp. 2136–2143. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.04.079
9. Dang D.A., Nguyen V.T., Vu D.T., Nguyen T.H., Nguyen D.M., Yuhuan W., Baoming J., Nguyen D.H., Le T.L., Rotavin-M1 Vaccine Trial Group. A dose-escalation safety and immunogenicity study of a new live attenuated human rotavirus vaccine (Rotavin-M1) in Vietnamese children. *Vaccine*, 2012, vol. 27, no. 30, suppl. 1, pp. 114–121. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.07.118
 10. Desselberger U., Huppertz H.I. Immune responses to rotavirus infection and vaccination and associated correlates of protection. *J. Infect. Dis.*, 2011, vol. 15, no. 203 (2), pp. 188–195. doi: 10.1093/infdis/jiq031
 11. Drummond A.J., Suchard M.A., Xie D., Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUTi and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.*, 2012, vol. 29, no. 8, pp. 1969–1973. doi: 10.1093/molbev/mss075
 12. Fu C., He Q., Xu J., Xie H., Ding P., Hu W., Dong Z., Liu X., Wang M. Effectiveness of the Lanzhou lamb rotavirus vaccine against gastroenteritis among children. *Vaccine*, 2012, vol. 17, no. 31 (1), pp. 154–158. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.10.078
 13. Honeyman M.C., Stone N.L., Falk B.A., Nepom G., Harrison L.C. Evidence for molecular mimicry between human T cell epitopes in rotavirus and pancreatic islet autoantigens. *J. Immunol.*, 2010, vol. 184, no. 4, pp. 2204–2210. doi: 10.4049/jimmunol.0900709
 14. Kirkwood C., Masendycz P.J., Coulson B.S. Characteristics and location of cross-reactive and serotype-specific neutralization sites on VP7 of human G type 9 rotaviruses. *Virology*, 1993, vol. 196, no. 1, pp. 79–88.
 15. Kulkarni R., Arora R., Arora R., Chitambar S.D. Sequence analysis of VP7 and VP4 genes of G1P[8] rotaviruses circulating among diarrhoeic children in Pune, India: a comparison with Rotarix and RotaTeq vaccine strains. *Vaccine*, 2014, vol. 11, no. 32, suppl. 1, pp. 75–83. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.03.080
 16. Matthijnssens J., Heylen E., Zeller M., Rahman M., Lemey P., Van Ranst M. Phylodynamic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread. *Mol. Biol. Evol.*, 2010, vol. 27, no. 10, pp. 2431–2436. doi: 10.1093/molbev/msq137
 17. Morozova O.V., Sashina T.A., Fomina S.G., Novikova N.A. Comparative characteristics of the VP7 and VP4 antigenic epitopes of the rotaviruses circulating in Russia (Nizhny Novgorod) and the Rotarix and RotaTeq vaccines. *Arch. Virol.*, 2015, vol. 160, no. 7, pp. 1693–1703. doi: 10.1007/s00705-015-2439-6
 18. Mouna B.H., Hamida-Rebaï M.B., Heylen E., Zeller M., Moussa A., Kacem S., Van Ranst M., Matthijnssens J., Trabelsi A. Sequence and phylogenetic analyses of human rotavirus strains: comparison of VP7 and VP8(*) antigenic epitopes between Tunisian and vaccine strains before national rotavirus vaccine introduction. *Infect. Genet. Evol.*, 2013, no. 18, pp. 132–144. doi: 10.1016/j.meegid.2013.05.008
 19. Nair N., Feng N., Blum L.K., Sanyal M., Ding S., Jiang B., Sen A., Morton J.M., He X.S., Robinson W.H., Greenberg H.B. VP4- and VP7-specific antibodies mediate heterotypic immunity to rotavirus in humans. *Sci. Transl. Med.*, 2017, vol. 21, no. 9, pp. 1–12. doi: 10.1126/scitranslmed.aam5434
 20. PATH (2011–2017). URL: <http://sites.path.org/rotavirusvaccine>
 21. Payne D.C., Boom J.A., Staat M.A., Edwards K.M., Szilagyi P.G., Klein E.J., Selvarangan R., Azimi P.H., Harrison C., Moffatt M., Johnston S.H., Sahni L.C., Baker C.J., Rench M.A., Donauer S., McNeal M., Chappell J., Weinberg G.A., Tasslimi A., Tate J.E., Wikswa M., Curns A.T., Sulemana I., Mijatovic-Rustempasic S., Esona M.D., Bowen M.D., Gentsch J.R., Parashar U.D. Effectiveness of pentavalent and monovalent rotavirus vaccines in concurrent use among US children < 5 years of age, 2009–2011. *Clin. Infect. Dis.*, 2013, vol. 57, no. 1, pp. 13–20. doi: 10.1093/cid/cit164
 22. Potts W.K., Slev P.R. Pathogen-based models favoring MHC genetic diversity. *Immunol. Rev.*, 1995, no. 143, pp. 181–197.
 23. Ruiz-Palacios G.M., Pérez-Schael I., Velázquez F.R., Abate H., Breuer T., Clemens S.C., Chevart B., Espinoza F., Gillard P., Innis B.L., Cervantes Y., Linhares A.C., López P., Macías-Parra M., Ortega-Barria E., Richardson V., Rivera-Medina D.M., Rivera L., Salinas B., Pavía-Ruz N., Salmerón J., Rüttimeann R., Tinoco J.C., Rubio P., Nuñez E., Guerrero M.L., Yarzabal J.P., Damaso S., Tornieporth N., Sáez-Llorens X., Vergara R.F., Vesikari T., Bouckenoghe A., Clemens R., De Vos B., O’Ryan M., Human Rotavirus Vaccine Study Group. Human Rotavirus Vaccine Study Group, Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N. Engl. J. Med.*, 2006, vol. 5, no. 354, pp. 11–22.
 24. Sabbe M., Berger N., Blommaert A., Ogunjimi B., Grammens T., Callens M., Van Herck K., Beutels P., Van Damme P., Bilcke J. Sustained low rotavirus activity and hospitalisation rates in the post-vaccination era in Belgium, 2007 to 2014. *Euro Surveill.*, 2016, vol. 7, no. 21, pp. 1–12. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.27.30273
 25. Santos N., Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev. Med. Virol.*, 2005, vol. 15, no. 1, pp. 29–56.
 26. Sashina T.A., Morozova O.V., Epifanova N.V., Novikova N.A. Predominance of new G9P[8] rotaviruses closely related to Turkish strains in Nizhny Novgorod (Russia). *Arch. Virol.*, 2017, vol. 162, no. 8, pp. 2387–2392. doi: 10.1007/s00705-017-3364-7
 27. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 2011, vol. 28, no. 10, pp. 2731–2739. doi: 10.1093/molbev/msr121
 28. Velázquez R.F., Linhares A.C., Muñoz S., Seron P., Lorca P., DeAntonio R., Ortega-Barria E. Efficacy, safety and effectiveness of licensed rotavirus vaccines: a systematic review and meta-analysis for Latin America and the Caribbean. *BMC Pediatr.*, 2017, vol. 17, no. 14, pp. 1–12. doi: 10.1186/s12887-016-0771-y
 29. Veselova O.A., Podkolzin A.T., Petukhov D.N., Kuleshov K.V., Shipulin G.A. Rotavirus group A surveillance and genotype distribution in Russian Federation in seasons 2012–2013. *Int. J. Clin. Med.*, 2014, vol. 5, no. 7, pp. 407–413. doi: 10.4236/ijcm.2014.57055
 30. Vesikari T., Matson D.O., Dennehy P., Van Damme P., Santosham M., Rodriguez Z., Dallas M.J., Heyse J.F., Goveia M.G., Black S.B., Shinefield H.R., Christie C.D., Ylitalo S., Itzler R.F., Coia M.L., Onorato M.T., Adeyi B.A., Marshall G.S., Gothefors L., Campens D., Karvonen A., Watt J.P., O’Brien K.L., DiNubile M.J., Clark H.F., Boslego J.W., Offit P.A., Heaton P.M., Rotavirus Efficacy and Safety Trial (REST) Study Team. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N. Engl. J. Med.*, 2006, vol. 5, no. 354, pp. 23–33.

31. Wei J., Li J., Zhang X., Tang Y., Wang J., Wu Y. A naturally processed epitope on rotavirus VP7 glycoprotein recognized by HLA-A2.1-restricted cytotoxic CD8+ T cells. *Viral Immunol.*, 2009, vol. 22, no. 3, pp. 189–194. doi: 10.1089/vim.2008.0091
32. World Health Organization. Global Advisory Committee on Vaccine Safety, 11–12 June 2014. *Wkly Epidemiol. Rec.*, 2014, vol. 29, no. 89, pp. 321–336.
33. Zeller M., Patton J.T., Heylen E., De Coster S., Ciarlet M., Van Ranst M., Matthijnssens J. Genetic analyses reveal differences in the VP7 and VP4 antigenic epitopes between human rotaviruses circulating in Belgium and rotaviruses in Rotarix and RotaTeq. *J. Clin. Microbiol.*, 2012, vol. 50, no. 3, pp. 966–976. doi: 10.1128/JCM.05590-11

Авторы:

Морозова О.В., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия; аспирант кафедры молекулярной биологии и иммунологии Института биологии и биомедицины ФГБОУ Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия;

Сашина Т.А., научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;

Епифанова Н.В., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;

Новикова Н.А., д.б.н., профессор, зав. лабораторией молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия; профессор кафедры молекулярной биологии и иммунологии Института биологии и биомедицины ФГБОУ Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия.

Authors:

Morozova O.V., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Epidemiology of Viral Infections, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation; PhD Student of Molecular Biology and Immunology Department of Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Sashina T.A., Researcher, Laboratory of Molecular Epidemiology of Viral Infections, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Epifanova N.V., Leading Researcher, Laboratory of Molecular Epidemiology of Viral Infections, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Novikova N.A., PhD, MD (Biology), Professor, Head of the Laboratory of Molecular Epidemiology of Viral Infections, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation; Professor of Molecular Biology and Immunology Department of Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation.

ИММУНОГЕННОСТЬ И ЗАЩИТНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЖИВОЙ И ИНАКТИВИРОВАННОЙ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ ВИРУСОВ ГРИППА А (H5N1) ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ИХ ДЛЯ ПРАЙМ-БУСТ ИММУНИЗАЦИИ МЫШЕЙ

И.В. Лосев, Г.Д. Петухова, И.Н. Исакова-Сивак, Л.Г. Руденко

ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Случаи заболевания людей птичьими вирусами гриппа А (H5N1) характеризуются тяжелыми клиническими проявлениями и высоким уровнем летальности. Основная проблема вакцин H5N1 заключается в их низкой иммуногенности для людей. Прайм-буст иммунизация считается эффективным подходом к усилению иммуногенности вакцин. Целью данной работы было сравнение иммунного ответа и защитной эффективности при использовании следующих схем прайм-буст иммунизации мышей: 1) праймирование и бустирование живой гриппозной вакциной (ЖГВ) A/17/Turkey/Turkey/05/133 (H5N2); 2) праймирование ЖГВ A/17/Turkey/Turkey/05/133 (H5N2) и бустирование инактивированной гриппозной вакциной (ИГВ) «Орни-флю» (H5N1). Оба способа характеризовались усилением продукции сывороточных антител к гомологичным и гетерологичным штаммам вируса гриппа А. Достоверное увеличение титров антител к гомологичному штамму по данным РТГА обнаруживалось только при двукратной вакцинации ЖГВ. Более чувствительный метод ИФА выявил достоверное увеличение титров специфичных к вирусу сывороточных IgG как при обоих способах прайм-буст иммунизации, так и при однократном введении мышам ЖГВ или ИГВ. Бустирование как ЖГВ, так и ИГВ достоверно повышало титры сывороточных IgG к другим генетическим линиям вирусов А (H5N1): в большей степени к гомологичному A/NIBRG-23 (clade 2.2), штамму A/Indonesia (clade 2.1) и в меньшей степени к более генетически удаленному A/Vietnam (clade 1), а также к гетерологичному A/New York (H1N1). Однократная вакцинация ЖГВ также вызывала достоверный прирост антител ко всем использованным вирусам, хотя количественно меньший, чем при любой прайм-буст иммунизации. По способности стимулировать специфичные к гомологичному штамму CD8⁺ Т-лимфоциты селезенки, оптимальной схемой оказалась прайм-буст иммунизация ЖГВ/ИГВ, которая привела к достоверному увеличению этих клеток по сравнению с контрольной группой, в отличие от всех остальных случаев. Обе бустлирующие вакцины (ЖГВ и ИГВ) показали высокий уровень защиты при летальном челлендже вирусом А (H1N1) и снижение титров вируса в легких по сравнению с отрицательным контролем. Оба способа прайм-буст иммунизации приводили к практически полному клиренсу вирусов А (H5N1) в легких и носовых ходах мышей, вне зависимости

Адрес для переписки:

Петухова Галина Дмитриевна
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12,
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.
Тел.: 8 (921) 759-96-06 (моб.).
E-mail: gala.iem@gmail.com

Contacts:

Galina D. Petukhova
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Academic Pavlov str., 12, Institute of Experimental Medicine.
Phone: +7 (921) 759-96-06 (mobile).
E-mail: gala.iem@gmail.com

Библиографическое описание:

Лосев И.В., Петухова Г.Д., Исакова-Сивак И.Н., Руденко Л.Г.
Иммуногенность и защитная эффективность живой
и инактивированной гриппозных вакцин против вирусов гриппа
А (H5N1) при использовании их для прайм-буст иммунизации мышей //
Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 1. С. 67–75. doi: 10.15789/2220-
7619-2019-1-67-75

Citation:

Losev I.V., Petukhova G.D., Isakova-Sivak I.N., Rudenko L.G. Immunogenicity
and protective efficacy of prime-boost immunization in mice vaccinated
with live and inactivated influenza A (H5N1) vaccines // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 67–
75. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-67-75

от штамма. Полученные результаты свидетельствуют о формировании перекрестного иммунитета к вирусам А (H5N1), относящимся к различным кладам и о целесообразности прайм-буст вакцинации для формирования иммунитета к птичьим вирусам А (H5N1).

Ключевые слова: гриппозные вакцины, грипп, прайм-буст иммунизация, вакцинация, живая аттенуированная гриппозная вакцина, А (H5N2).

IMMUNOGENICITY AND PROTECTIVE EFFICACY OF PRIME-BOOST IMMUNIZATION IN MICE VACCINATED WITH LIVE AND INACTIVATED INFLUENZA A (H5N1) VACCINES

Losev I.V., Petukhova G.D., Isakova-Sivak I.N., Rudenko L.G.

Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Avian influenza A (H1N1) in humans is characterized by severe clinical manifestation and high mortality. The main drawback of current human H5N1 vaccines is related to low immunogenicity. Prime-boost vaccination is considered as an effective approach to enhance vaccine immunogenicity. The aim of this study was to compare immune response and protective efficacy of diverse prime-boost immunization protocols: 1) prime and boost with live influenza vaccine (LAIV) A/17/Turkey/Turkey/05/133 (H5N2); 2) prime with LAIV A/17/Turkey/Turkey/05/133 (H5N2) followed by boost with inactivated influenza vaccine (IIV) "Orniflu" (H5N1). Both vaccination protocols were found to increase serum antibody level against homologous and heterologous influenza A virus strains. In particular, serum HAI antibodies were significantly elevated solely after LAIV/LAIV vaccination. A more sensitive sandwich ELISA assay revealed that serum virus-specific IgG antibody levels were significantly increased after both vaccination protocols as well as after a single LAIV or IIV vaccination. Both LAIV and IIV boost increased titers of serum IgG specific against unrelated influenza A (H5N1) strains: homologous A/NIBRG-23 (clade 2.2), A/Indonesia (clade 2.1) and, to a lesser extent, against clade 1 virus A/Vietnam and even against heterologous A/New York (H1N1). Single LAIV vaccination was also able to induce antibody responses against all strains examined, though to a lesser degree as compared with either prime-boost protocols. However, amount of splenic CD8⁺ T cells specific to homologous influenza A virus strain was solely observed after LAIV/IIV vaccination. Moreover, both LAIV and IIV boosting effect demonstrated high protection level against lethal challenge with A (H1N1) WT virus and significantly decreased lung viral titer compared to control group. Furthermore, both regimens resulted in lung virus clearance after non-lethal challenge with clade 1, 2.1 or 2.2 influenza A (H5N1). In conclusion, we demonstrated that both LAIV/LAIV and LAIV/IIV regimens were able to induce cross-clade A (H5N1) response and that prime-boost immunization was a promising approach to improve immunogenicity of influenza A (H5N1) virus vaccine.

Key words: influenza vaccines, influenza, prime-boost immunization, vaccination, live attenuated influenza vaccine, influenza virus A (H5N2).

Введение

Высокопатогенные вирусы гриппа А (H5N1) циркулируют в популяции диких и домашних птиц с 1997 г. с периодическим инфицированием людей [1]. Случаи заболевания людей птичьими вирусами гриппа характеризовались тяжелыми клиническими проявлениями и высоким уровнем летальности [6]. Поскольку наиболее действенным методом борьбы с гриппозной инфекцией остается вакцинопрофилактика [23], ВОЗ было принято решение о создании резервных вакцин против всех потенциально пандемических вирусов гриппа птичьего, животного и человеческого происхождения [10]. В рамках этой программы разными коллективами авторов в мире был разработан ряд гриппозных вакцин, как живых, так и инактивированных, против вирусов гриппа птиц А (H5N1) [11]. В большинстве случаев, полученные вакцины были ареактогенны, но слабо иммуногенны [2]. Одним из перспективных подходов к усилению иммуногенности вакцин считается прайм-буст иммунизация, которая

приводит к быстрому и интенсивному накоплению сывороточных иммуноглобулинов в ответ на введение праймированным реципиентам гомологичных или гетерологичных вакцинных штаммов вируса гриппа А [21].

Сезонные живые аттенуированные гриппозные вакцины (ЖГВ) являются безопасным и эффективным средством профилактики гриппа в отношении как гомологичных, так и гетерологичных сезонных штаммов [3, 4, 19]. Однако клинические испытания потенциально пандемической ЖГВ А/17/Turkey/Turkey/05/133 (H5N2) на волонтерах показали ее невысокую иммуногенность после двукратного введения в отношении как гуморального, так и клеточного иммунного ответа [17]. В дальнейших исследованиях было установлено, что несмотря на сниженную по сравнению с сезонными штаммами иммуногенность, вакцинация формирует долговременную иммунологическую память, приводящую к усилению иммунного ответа на буст-иммунизацию инактивированной гриппозной вакциной (ИГВ) А (H5N1) [16, 18].

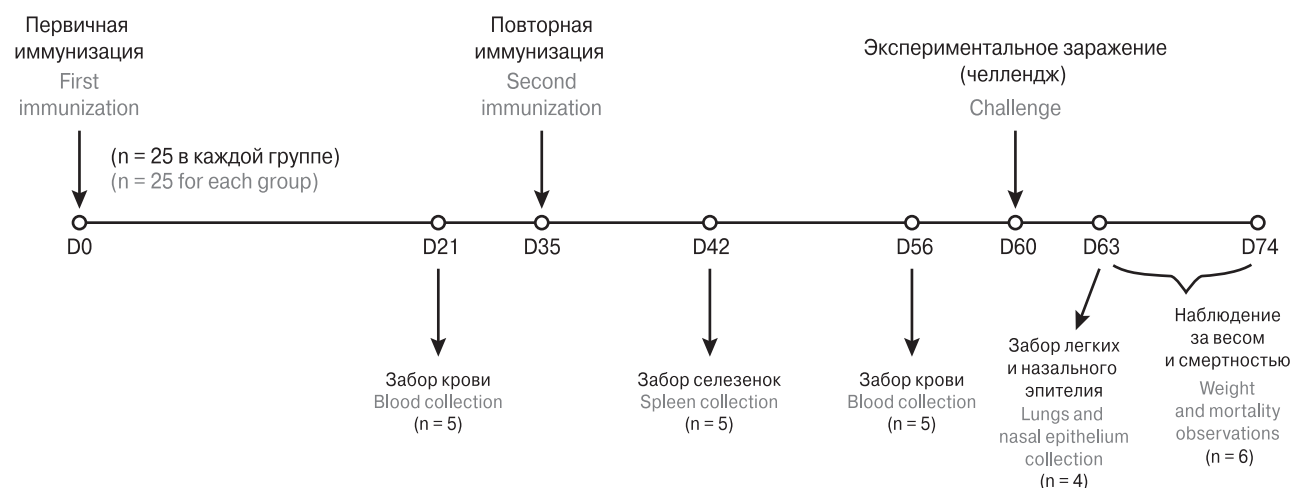


Рисунок 1. Схема исследования и характеристики вирусов

Figure 1. Study design and virus characteristics

Целью данной работы явилось сравнение иммунного ответа мышей при использовании следующих схем прайм-буст вакцинации: 1) праймирование и бустирование ЖГВ A/17/Turkey/Turkey/05/133 (H5N2); 2) праймирование ЖГВ A/17/Turkey/Turkey/05/133 (H5N2) и бустирование ИГВ «Орнифлю» (H5N1); оценка защитного эффекта обеих схем при последующем экспериментальном заражении мышей гомологичными и гетерологичными штаммами вируса гриппа А.

Материалы и методы

Исследование проводили на самках мышей линии СВА. Животные были разделены на 5 групп по 35 мышей, каждой из которых была проведена первичная и повторная иммунизация с последующим экспериментальным заражением четырьмя различными штаммами вируса гриппа А. Для сравнения бустированного эффекта живой (ЖГВ) и инактивированной (ИГВ) гриппозных вакцин, в опытных группах 1 и 2 первичная иммунизация проводилась ЖГВ, а повторная иммунизация — либо ЖГВ (в группе 1), либо ИГВ (в группе 2). В контрольных группах 3, 4 и 5 один или оба препарата были заменены стерильным фосфатно-солевым буфером (PBS). Праймирующую моновалентную ЖГВ A/17/Turkey/Turkey/05/133 (H5N2) вводили интраназально в дозе 100 MID₅₀/50 мкл. Буст-иммунизацию проводили через 1 месяц после первичной иммунизации. ЖГВ вводили тем же способом; ИГВ «Орнифлю» (Микроген, Иркутск) вводили внутримышечно по 50 мкл (1,5 мкг гемагглютинаина). Еще через месяц после буст-вакцинации, каждая группа мышей была разделена на 4 подгруппы, которые были заражены следующими вирусами: А) A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) × PR8, clade 1 (по 4

мыши); Б) A/Indonesia/05/2005 (H5N1) × PR8, clade 2.1 (по 4 мыши) и В) A/NIBRG-23 (H5N1), clade 2.2 (по 4 мыши) (вирусы вводили в дозе 100 MID₅₀/50 мкл), а также Г) 10 LD₅₀/50 мкл эпидемического вируса A/New York/61/15 (H1N1) (по 8 мышей) [12]. Схема исследования представлена на рисунке 1; распределение животных по группам и характеристики вирусов — в таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Экспериментальные группы

Table 1. Experimental groups

Группа Group	Первичная иммунизация First immunization	Повторная иммунизация Second immunization	Челлендж Challenge
1	ЖГВ* LAIV*	ЖГВ LAIV	H1N1 wt H5N1 (cl. 1) H5N1 (cl. 2,1) H5N1 (cl. 2,2)
2	ЖГВ LAIV	ИГВ** IIV	H1N1 wt H5N1 (cl. 1) H5N1 (cl. 2,1) H5N1 (cl. 2,2)
3	ЖГВ LAIV	PBS***	H1N1 wt H5N1 (cl. 1) H5N1 (cl. 2,1) H5N1 (cl. 2,2)
4	PBS	ИГВ IIV	H1N1 wt H5N1 (cl. 1) H5N1 (cl. 2,1) H5N1 (cl. 2,2)
5	PBS	PBS	H1N1 wt H5N1 (cl. 1) H5N1 (cl. 2,1) H5N1 (cl. 2,2)

Примечание. *ЖГВ — живая гриппозная вакцина;

**ИГВ — инактивированная гриппозная вакцина;

***PBS — фосфатно-солевой буфер.

Note. *LAIV — live attenuated influenza vaccine; **IIV — inactivated influenza vaccine; ***PBS — phosphate buffered saline.

Накопление вирусов гриппа проводили в аллантоисной полости 10-дневных развивающихся куриных эмбрионов (ЗАО «Птицефабрика Синявинская», Кировский район, Ленинградская область) [5]. Вирус из вирусосодержащей жидкости выделяли при помощи ультрацентрифугирования с очисткой на градиенте сахарозы, и хранили при температуре -70°C до использования в экспериментах.

Инфекционную дозу живых вирусов гриппа подбирали путем определения их MID_{50} (mouse infectious dose 50%) на мышях той же линии (СВА) стандартным методом [13]. Для вируса A/New York/61/15 (H1N1) определяли также LD_{50} (lethal dose 50%) [13]. Инактивированную грип-

позную вакцину «Орнифлю» вводили внутримышечно в дозе 1,5 мкг гемагглютинаина.

Интенсивность репродукции вирусов в верхних и нижних отделах дыхательного тракта оценивалась с помощью титрования гомогенатов тканей в развивающихся куриных эмбрионах [4]. Изъятие тканей верхнего отдела дыхательных путей и легких производили на 3 сутки после заражения. В каждой из групп, подвергшихся праймированию, бустированию и заражению одним из четырех вирусов, было отобрано по 4 мыши; 50% инфекционную дозу рассчитывали по методу Рида и Менча [13].

Титры антигемагглютинирующих антител в сыворотках крови иммунизированных живот-

Таблица 2. Характеристики вирусов

Table 2. Characteristics of viruses

	Вирусы Viruses	Описание, доза Description, doses
ЖГВ* LAIV*	A/17/Turkey/Turkey/05/133 (H5N2)	Штамм для ЖГВ, содержащий 7 генов (6 внутренних белков и нейраминидазы) от донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и 1 ген (гемагглютинаина) от вируса NIBRG-23. Вводилась интраназально в дозе 100 $\text{MID}_{50}/50$ мкл Strain for LAIV containing 7 genes (6 genes of internal proteins and gene of NA) from master donor strain A/Leningrad//134/17/57 (H2N2) and 1 gene (HA) from NIBRG-23 strain. Administered intranasally at 100 $\text{MID}_{50}/50$ μl .
ИГВ** IIV**	«Орнифлю» (Микроген, Иркутск) "Orniflu" (Microgen, Irkutsk)	Очищенные гемагглютинин и нейраминидаза вируса NIBRG-23. Вводилась внутримышечно в дозе 1,5 мкг гемагглютинаина/50 мкл Purified HA and NA proteins of NIBRG-23 strain. Administered intramuscularly at 1,5 50 μg of HA/50 μl .
H1N1 wt	A/New York/61/15 (H1N1) wt	Патогенный для мышей вирус. Вводился интраназально в дозе 10 $\text{LD}_{50}/50$ мкл Pathogenic for mice. Administered intranasally at 10 $\text{LD}_{50}/50$ μl .
H5N1 (cl. 1)	A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) \times PR8	6 внутренних генов от вируса А/PR8 (H1N1) и 2 наружных (гемагглютинаина и нейраминидазы) от птичьего вируса А/Vietnam/1203/2004 (H5N1) wt. Вводился интраназально в дозе 100 $\text{MID}_{50}/50$ мкл 6 genes of internal proteins from A/PR8 (H1N1) and 2 genes of external proteins (HA, NA) from avian virus A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) wt. Administered intranasally at 100 $\text{MID}_{50}/50$ μl .
H5N1 (cl. 2,1)	A/Indonesia/05/2005 (H5N1) \times PR8	6 внутренних генов от вируса А/PR8 (H1N1) и 2 наружных (гемагглютинаина и нейраминидазы) от птичьего вируса А/Indonesia/05/2005 (H5N1) wt. Вводился интраназально в дозе 100 $\text{MID}_{50}/50$ мкл 6 genes of internal proteins from A/PR8 (H1N1) and 2 genes of external proteins (HA, NA) from avian virus A/Indonesia/05/2005 (H5N1) wt. Administered intranasally at 100 $\text{MID}_{50}/50$ μl .
H5N1 (cl. 2,2)	A/NIBRG-23 (H5N1)	6 внутренних генов от вируса А/PR8 (H1N1) и 2 наружных (гемагглютинаина и нейраминидазы) от птичьего вируса А/turkey/Turkey/05/2005 (H5N1) wt. Вводился интраназально в дозе 100 $\text{MID}_{50}/50$ мкл 6 genes of internal proteins from A/PR8 (H1N1) and 2 genes of external proteins (HA, NA) from avian virus A/turkey/Turkey/05/2005 (H5N1) wt. Administered intranasally at 100 $\text{MID}_{50}/50$ μl .

Примечание. *ЖГВ — живая гриппозная вакцина; **ИГВ — инактивированная гриппозная вакцина.

Note. *LAIV — live attenuated influenza vaccine; **IIV — inactivated influenza vaccine.

ных определяли с помощью реакции торможения геммагглютинации (РТГА) по общепринятой методике [5]. В качестве антигена использовали вирус A/17/Turkey/Turkey/05/133 (H5N2) в дозе 4 геммагглютинирующих единицы (ГАЕ) на лунку.

Специфичные к вирусу IgG в сыворотках крови определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА), используя предварительно очищенные с помощью ультрацентрифугирования на градиенте плотности сахарозы (30–60%) вирусы A/17/Turkey/Turkey/05/133 (H5N2); A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) × PR8; A/Indonesia/05/2005 (H5N1) × PR8; A/NIBRG-23 (H5N1); A/New York/61/15 (H1N1). Антигены сорбировали в дозе 16 ГАЕ на лунку в плоскодонных полистироловых планшетах (Медполимер, Россия) при +4°C в течение 12 ч. Далее после трехкратной промывки лунок планшета фосфатно-солевым буфером с 0,05% Твином-20, добавляли блокирующий раствор 1% бычьего сывороточного альбумина и повторяли промывку. Уровни сывороточных IgG измеряли с помощью меченных пероксидазой хрена моноклональных антител (Sigma) согласно рекомендациям производителя. За титр антител принимали последнее разведение образца, оптическая плотность которого превышала

в 2 и более раза среднее арифметическое значение оптической плотности контрольных лунок (все компоненты кроме образцов).

Количественный анализ CD4⁺ и CD8⁺ T-лимфоцитов селезенки проводили методом проточной цитометрии. Для выявления специфичных к вирусу T-клеток использовали метод внутриклеточного окрашивания цитокинов (IFN γ) [8] после стимуляции клеток *in vitro* 3 MOI (multiplicity of infection) очищенного вируса A/17/Turkey/Turkey/05/133 (H5N2). Для определения спонтанной интерферонопродукции, вместо вируса к клеткам добавляли соответствующий объем питательной среды DMEM (Биолот, Россия). При анализе эти данные (отрицательный контроль) вычитались из показателей, полученных для вирусстимулированных клеток. В качестве положительного контроля использовалась стимуляция клеток конканавалином А, который вызывает поликлональную неспецифическую активацию T-лимфоцитов.

Статистическую обработку результатов проводили при помощи непараметрического критерия Манна–Уитни с использованием программ «Statistica 6.0» и «GraphPad Prism 6». Различия считались достоверными, если значение *p* не превышало 0,05.

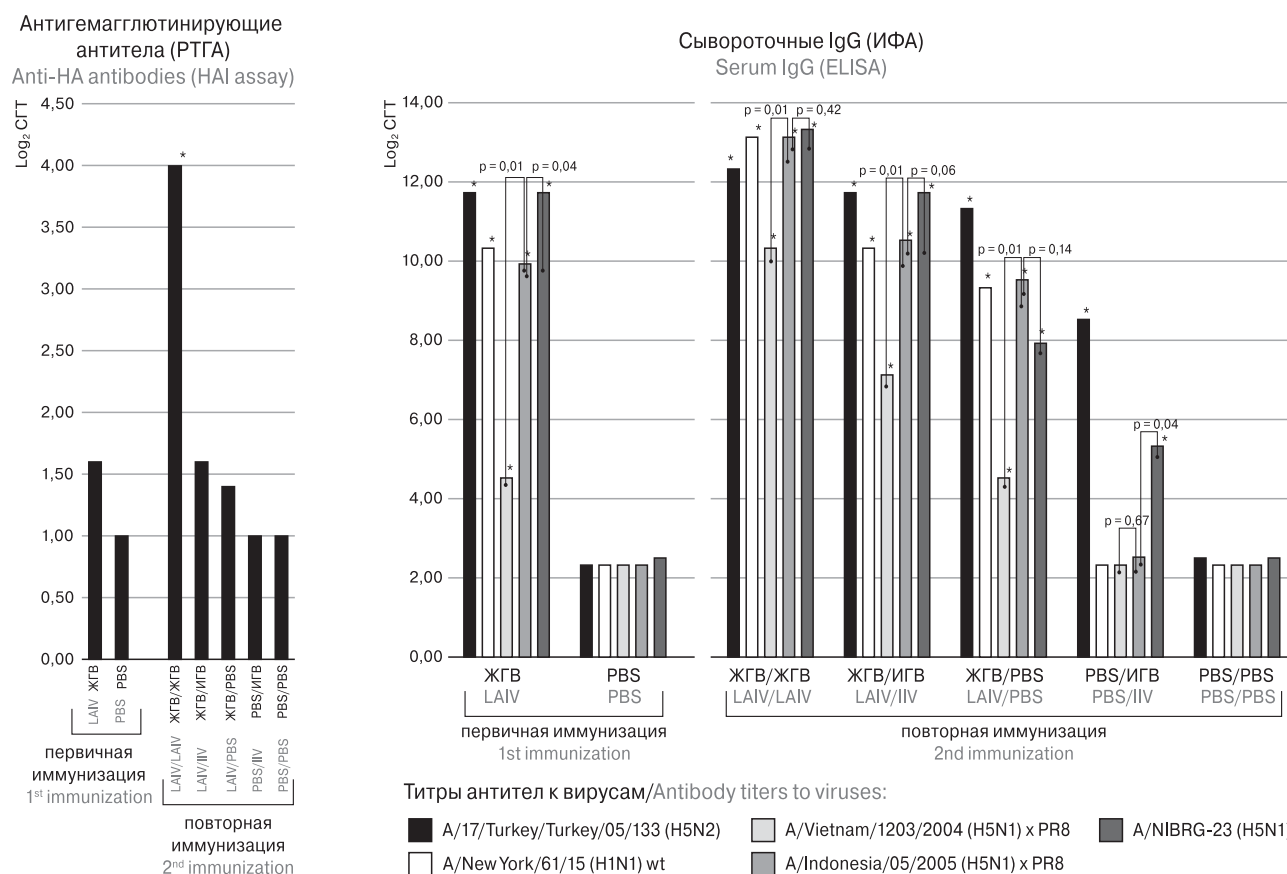


Рисунок 2. Уровни антител к гомологичным и гетерологичным штаммам

Figure 2. Levels of antibodies to homologous and heterologous strains

Результаты

Оба способа прайм-буст вакцинации характеризовались усилением продукции сывороточных антител к гомологичным и гетерологичным штаммам вируса гриппа А. Достоверное увеличение титров антигемагглютинирующих антител к гомологичному штамму по данным РТГА обнаруживалось только при двукратной вакцинации ЖГВ (рис. 2).

Более чувствительный метод ИФА выявил достоверное увеличение титров специфичных к вирусу сывороточных IgG как при обоих способах прайм-буст иммунизации, так и при однократном введении мышам ЖГВ или ИГВ (контрольные группы ЖГВ/PBS и PBS/ИГВ). Бустирование как живой, так и инактивированной вакциной достоверно повышало титры сывороточных IgG к другим генетическим линиям вирусов А (H5N1): в большей степени к гомологичному A/NIBRG-23 (clade 2.2), а также штамму A/Indonesia (clade 2.1) и в меньшей степени к более генетически удаленному A/Vietnam (clade 1), а также к гетерологичному A/New York (H1N1).

При этом однократная вакцинация ЖГВ также вызывала достоверный прирост антител ко всем использованным вирусам, хотя количественно меньший, чем при любой прайм-буст иммунизации. Однократная вакцинация ИГВ увеличивала титры сывороточных IgG только к гомологичным штаммам (A/17/Turkey/Turkey/05/133 (H5N2) и A/NIBRG-23 (H5N1)).

По способности стимулировать специфичные к гомологичному штамму CD8⁺ Т-лимфоциты селезенки, оптимальной схемой оказалась прайм-буст иммунизация ЖГВ/ИГВ,

которая привела к достоверному увеличению этих клеток по сравнению с контрольной группой в отличие от всех остальных случаев. Максимальные количественные показатели уровней CD4⁺ (Th1) клеток достигались при однократном введении любой из вакцин. Повторное введение ЖГВ приводило к снижению количества CD4⁺ с увеличением уровней CD8⁺ Т-лимфоцитов (рис. 3).

В таблице 3 представлены данные о репродукции вируса в дыхательных путях, выживаемости и весе мышей после заражения 10 летальными дозами «дикого» вируса A/New York/61/15 (H1N1). Несмотря на то, что число животных в группе было небольшим (4 мыши), тем не менее схемы прайм-буст ЖГВ/ЖГВ, ЖГВ/ИГВ и ЖГВ/PBS показали достоверный уровень защиты от летального челленджа гетерогенным «диким» вирусом, по сравнению с отрицательным контролем (группа 5). При двукратной иммунизации ЖГВ степень защиты составила 100%, и был достигнут полный клиренс вируса в носовых ходах. Однократная иммунизация ЖГВ хуже справлялась с клиренсом вируса из верхних и нижних дыхательных путей, однако также защитила от летальности всех мышей в группе, в то время как однократная иммунизация ИГВ — только 33,3%.

При экспериментальном заражении (нелетальном) различными вирусами А (H5N1), оба способа прайм-буст иммунизации приводили к практически полному клиренсу вирусов в легких и носовых ходах мышей вне зависимости от штамма. Этот же результат достигался и при однократном введении ЖГВ, а однократной иммунизации ИГВ для достижения такого эффекта оказалось недостаточно (табл. 4).

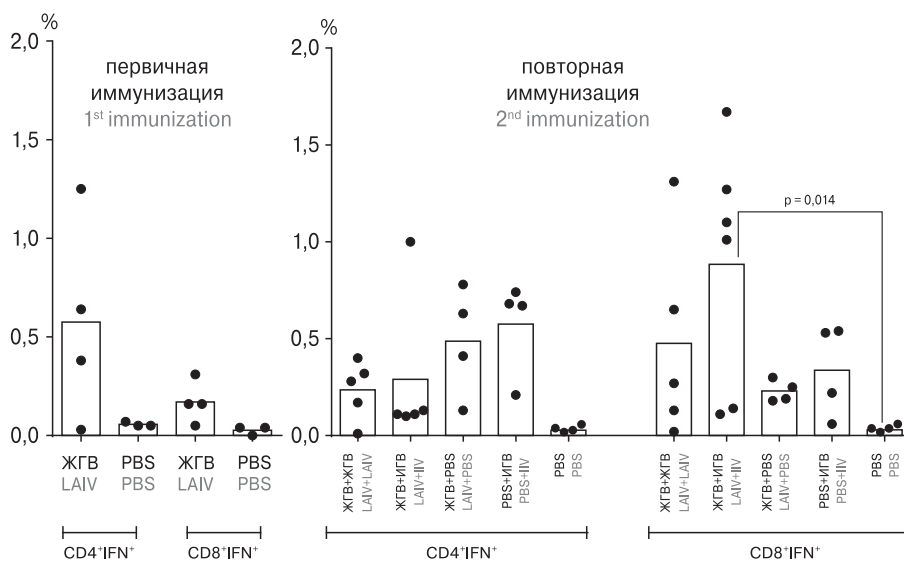


Рисунок 3. Уровни CD4⁺IFNγ⁺ и CD8⁺IFNγ⁺ Т-клеток к гомологичному вирусу A/17/Turkey/Turkey (H5N2)
Figure 3. CD4⁺IFNγ⁺ and CD8⁺IFNγ⁺ T-cell levels to homologous A/17/Turkey/Turkey (H5N2) virus

Таблица 3. Репродукция вируса в дыхательных путях и выживаемость мышей после экспериментального заражения вирусом A/New York/61/15 (H1N1)

Table 3. Influenza A virus reproduction of in mouse respiratory tract and survival rate after challenge with A/New York/61/15 (H1N1) strain

Группа Group	Схема иммунизации Immunization regimen	Титр вируса (lgEID ₅₀ /1 ml) Viral titer (lgEID ₅₀ /1 ml)		% (число) выживших мышей за 14 дней % (number) of mice survived by day 14	Максимальная потеря веса за 14 дней Maximal weight loss by day 14
		Легкие Lungs	Носовые ходы Nasal passage		
1	ЖГВ/ЖГВ LAIV/LAIV	4,4 (3,0–4,9)*	≤ 1,5* (≤ 1,5)	100% (all)	4,7%
2	ЖГВ/ИГВ LAIV/IIV	4,1 (3,7–5,0)*	2,1 (1,5–2,5)*	75% (3/4)	10,0%
3	ЖГВ/PBS LAIV/PBS	5,0 (4,8–5,2)*	2,6 (2,4–2,8)*	100% (all)	14,4%
4	PBS/ИГВ PBS/IIV	5,4 (5,2–5,6)	3,1 (2,5–3,8)	33,3% (1/3)	28,7%
5	PBS/PBS	5,7 (5,5–6,2)	3,6 (3,6–4,2)	25% (1/4)	20,2%

Примечание. *Достоверные снижения титров по сравнению с контрольной группой (p ≤ 0,05).

Note. *Significant decreases in comparison vs. control group (p ≤ 0.05).

Обсуждение

Основная проблема вакцин H5N1 заключается в их низкой иммуногенности для людей [2, 17]. Живая гриппозная вакцина (ЖГВ) обладает такими преимуществами, как интраназальное введение, возможность производства больших объемов вакцины в краткие сроки, и способность индуцировать долговременную память. Все перечисленное делает ЖГВ оптимальным препаратом выбора в экстренных ситуациях, например, для праймирования населения в начале пандемии. В исследованиях на волонте

рах была доказана праймирующая способность ЖГВ, однако широких исследований по сравнительной оценке иммуногенности и защитной эффективности различных схем прайм-буст иммунизации не проводилось.

Оба рассматриваемых нами способа прайм-буст иммунизации (ЖГВ/ЖГВ и ЖГВ/ИГВ), а также однократная иммунизация ЖГВ достоверно увеличивали титры сывороточных IgG к гетерологичным вирусам, в то время как однократного введения ИГВ для этого оказалось недостаточно. Перед нами не стояло задачи оценить схему ИГВ/ИГВ, однако данные других ав-

Таблица 4. Репродукция вирусов в дыхательных путях после экспериментального заражения вирусами A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) × PR8; A/Indonesia/05/2005 (H5N1) × PR8 и A/NIBRG-23 (H5N1)

Table 4. Reproduction of viruses in mice's respiratory tract after challenge with A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) × PR8; A/Indonesia/05/2005 (H5N1) × PR8 and A/NIBRG-23 (H5N1)

Группа Group	Схема иммунизации Immunization scheme	Титр вируса (lgEID ₅₀ /1 ml) Viral titer (lgEID ₅₀ /1 ml)					
		A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) × PR8		A/Indonesia/05/2005 (H5N1) × PR8		A/NIBRG-23 (H5N1)	
		Легкие Lungs	Носовые ходы Noses	Легкие Lungs	Носовые ходы Noses	Легкие Lungs	Носовые ходы Noses
1	ЖГВ/ЖГВ LAIV/LAIV	≤ 1,5*	≤ 1,5	≤ 1,5*	≤ 1,5*	≤ 1,5*	≤ 1,5
2	ЖГВ/ИГВ LAIV/IIV	≤ 1,5*	≤ 1,5	≤ 1,5*	1,9	≤ 1,5*	≤ 1,5
3	ЖГВ/PBS LAIV/PBS	≤ 1,5*	≤ 1,5	≤ 1,5*	≤ 1,5*	≤ 1,5*	≤ 1,5
4	PBS/ИГВ PBS/IIV	4,1	≤ 1,5	3,9	1,9	3,7	≤ 1,5
5	PBS/PBS	4,1	1,8	5,2	2,7	5,7	≤ 1,5

Примечание. *Достоверные снижения титров по сравнению с контрольной группой (p ≤ 0,05).

Note. *Significant decreases in comparison with control group (p ≤ 0.05).

торов по сплит-вакцине с адьювантом $Al(OH)_3$ [21] и культуральной цельновирионной ИГВ [20] показывают, что при соответствующем подборе доз такая схема тоже будет приводить к значительному увеличению уровней антител против различных штаммов А (H5N1). Эти же авторы [21] в своей публикации приводят данные по защитной эффективности инактивированных вакцин при летальном челлендже мышей вирусами А (H5N1) после гомологичной и гетерологичной прайм-буст иммунизации. Авторы отмечают высокую защитную эффективность как обоих методов прайм-буст, так и однократной вакцинации ИГВ, причем защитный эффект ИГВ был дозозависим. В нашем исследовании высокий уровень защиты от летального челленджа гетерогенным «диким» вирусом А (H1N1) показали схема прайм-буст ЖГВ/ЖГВ и однократная вакцинация ЖГВ. Однократная вакцинация ИГВ плохо защищала мышей в использованной нами дозе (1,5 мкг гемагглютинина), однако эта же доза в качестве буст-вакцины давала результаты, близкие к схеме ЖГВ/ЖГВ по защитной эффективности и клиренсу вируса А (H1N1) в дыхательных путях. Сходная картина наблюдалась и при экспериментальном заражении различными вирусами А (H5N1).

Стимуляция $CD4^+IFN\gamma^+$ Т-клеток происходила как в опытных, так и в контрольных (однократно вакцинированных) группах приблизительно

одинаково. В отношении $CD8^+IFN\gamma^+$ клеток, максимально выраженный эффект со статистически достоверным приростом $CD8^+$ на 7 день после повторной иммунизации в нашем эксперименте наблюдался только у схемы ЖГВ/ИГВ. Возможно, такой эффект связан с различной скоростью клеточного иммунного ответа при введении разных антигенов [15, 22] и может быть подробнее изучен в отдельном кинетическом эксперименте. Данные, полученные в клинических испытаниях на волонтерах, свидетельствуют о способности как ЖГВ А (H5N2) [18], так и ИГВ А (H5N1) [14] формировать долгоживущие клетки иммунологической памяти, но их фенотипы и антигенная специфичность, судя по имеющимся данным, различаются, что также требует отдельного подробного исследования.

В целом полученные результаты свидетельствуют о формировании перекрестного иммунитета к вирусам А (H5N1), относящимся к различным клейдам. Учитывая сходные данные, полученные с различными вакцинами независимыми группами исследователей [7, 13, 20–21], можно предположить, что перекрестный иммунитет к вирусам А (H1N1) может быть достигнут в случае повторной вакцинации практически любым вакцинным препаратом. Это говорит о целесообразности применения прайм-буст иммунизации для формирования иммунитета к птичьим вирусам А (H5N1).

Список литературы/References

1. Сергеева М.В., Крохин А., Матросович М., Матросович Т., Волшек М., Киселев О.И., Романова Ю.Р. Влияние конформационной стабильности гемагглютинина вируса гриппа на качество инактивированных вакцин H5N1 // *Microbiology Independent Research Journal*. 2014. Т. 1, № 1. С. 1–11. [Sergeeva M., Krokhin A., Matrosovich M., Matrosovich T., Wolschek M., Kiselev O., Romanova J. H5N1 influenza vaccine quality is affected by hemagglutinin conformational stability. *Microbiology Independent Research Journal*, 2014, vol. 1, no. 1, pp. 1–11. (In Russ.)]
2. Baz M., Luke C.J., Cheng X., Jin H., Subbarao K. H5N1 vaccines in humans. *Virus Res.*, 2013, vol. 178, iss. 1, pp. 78–98.
3. Brooks W.A., Zaman K., Lewis K.D., Ortiz J. R., Goswami D., Feser J., Sharmeen A.T., Nahar R., Rahman M., Rahman M.Z., Barin B., Yunus M., Fry A.M., Bresee J., Azim T., Kathleen K.M. Efficacy of a Russian-backbone live attenuated influenza vaccine among young children in Bangladesh: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Glob. Health*, 2016, vol. 4: e946–e954.
4. Caspard H., Heikkinen T., Belshe R.B., Ambrose C.S. A systematic review of the efficacy of live attenuated influenza vaccine upon revaccination of children. *Hum. Vacc. Immunother.*, 2016, vol. 12, no. 7, pp. 1721–1727.
5. Cottey R., Rowe C.A., Bender B.S. Influenza virus. *Curr. Protoc. Immunol.*, 2001, chapter 19: unit 19.11. doi: 10.1002/0471142735.im1911s42
6. Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A(H5N1) reported to WHO, 2003–2015. URL: http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/EN_GIP_20150303CumulativeNumberH5N1cases.pdf
7. Ebensen T., Debarry J., Pedersen G.K., Blazejewski P., Weissmann S., Schulze K., McCullough K.C., Cox R.J., Guzmán C.A. Mucosal administration of cycle-di-nucleotide-adjuvanted virosomes efficiently induces protection against influenza H5N1 in mice. *Front. Immun.*, 2017, vol. 8: 1223.
8. Foster B., Prussan C. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *Curr. Protoc. Immunol.*, 2007, chapter 6: unit 6.24. doi: 10.1002/0471142735.im0624s78
9. Friede M., Palkonyay L., Alfonso C., Pervikov Y., Torelli G., Wood D., Kiény M.P. WHO initiative to increase global and equitable access to influenza vaccine in the event of a pandemic: supporting developing country production. *Vaccine*, 2011, suppl. 29: A2–A7. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.02.079
10. Goji N.A., Nolan C., Hill H., Wolff M., Noah D.L., Williams T.B., Rowe T., Treanor J.J. Immune responses of healthy subjects to a single dose of intramuscular inactivated influenza A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) vaccine after priming with an antigenic variant. *J. Infect. Dis.*, 2008, vol. 198, iss. 5, pp. 635–641.
11. Houser K., Subbarao K. Influenza vaccines: challenges and solutions. *Cell Host Microbe*, 2015, vol. 17, no. 3, pp. 295–300.

12. Ikeno D., Kimachi K., Kudo Y., Goto S., Itamura S., Odagiri T., Tashiroc M. Kino Y. A prime-boost vaccination of mice with heterologous H5N1 strains. *Vaccine*, 2009, vol. 27, iss. 23, pp. 3121–3125.
13. Matsuoka Y., Lamirande E.W., Subbarao K. Mouse model for Influenza. *Curr. Protoc. Microbiol.*, 2009, chapter 15: unit 15G.3. doi: 10.1002/9780471729259.mc15g03s13
14. Nayak J.L., Richards K.A., Yang H., Treanor J.J., Sant A.J. Effect of influenza A(H5N1) vaccine prepandemic priming on CD4+ T-cell response. *J. Infect. Dis.*, 2015, vol. 211, iss. 9, pp. 1408–1417.
15. Peng Y., Wang B., Talaat K., Karron R., Powell T. J., Zeng H., Dong D., Luke C.J., McMichael A., Subbarao K., Dong T. Boosted influenza-specific T cell responses after H5N1 pandemic live attenuated influenza virus vaccination. *Front. Immunol.*, 2015, vol. 6: 287.
16. Pitisuttithum P., Boonnak K., Chamnanchanunt S., Puthavathana P., Luvira V., Lerdsamran H., Kaewkungwal J., Lawpoolsri S., Thanachartwet V., Silachamroon U., Masamae W., Schuetz A., Wirachwong P., Thirapakpoomanunt S., Rudenko L., Sparrow E., Friede M., Kieny M.P. Safety and immunogenicity of a live attenuated influenza H5 candidate vaccine strain A/17/Turkey/Turkey/05/133 H5N2 and its priming effects for potential pre-pandemic use: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Infect Dis.*, 2017, vol. 17, iss. 8, pp. 833–842.
17. Rudenko L., Kiseleva I., Stukova M., Erofeeva M., Naykhin A., Donina S., Larionova N., Pisareva M., Krivitskaya V., Flores J; Russian LAIV Trial Study Group. Clinical testing of pre-pandemic live attenuated A/H5N2 influenza candidate vaccine in adult volunteers: results from a placebo-controlled, randomized double-blind phase I study. *Vaccine*, 2015, vol. 33, iss. 39, pp. 5110–5117.
18. Rudenko L., Naykhin A., Donina S., Korenkov D., Petukhova G., Isakova-Sivak I., Losev I., Stukova M., Erofeeva M., Nikiforova A., Power M., Flores J. Assessment of immune responses to H5N1 inactivated influenza vaccine among individuals previously primed with H5N2 live attenuated influenza vaccine. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2015, vol. 11, no. 12, pp. 2839–2848.
19. Rudenko L., Yeolekar L., Kiseleva I., Isakova-Sivak I. Development and approval of live attenuated influenza vaccines based on Russian master donor viruses: process challenges and success stories. *Vaccine*, 2016, vol. 34, no. 45, pp. 5436–5441.
20. Sabarth N., Howard M.K., Savidis-Dacho H., van Maurik A., Barrett P.N., Kistner O. Comparison of single, homologous prime-boost and heterologous prime-boost immunization strategies against H5N1 influenza virus in a mouse challenge model. *Vaccine*, 2010, vol. 28, pp. 650–656.
21. Stephenson I., Nicholson K.G., Colegate A., Podda A., Wood J., Ypma E., Zambon M. Boosting immunity to influenza H5N1 with MF59-adjuvanted H5N3 A/Duck/Singapore/97 vaccine in a primed human population. *Vaccine*, 2003, vol. 21, no. 15, pp. 1687–1693.
22. Wang Z., Loh L., Kedzierski L., Kedzierska K. Avian influenza viruses, inflammation, and CD8+ T Cell immunity. *Front. Immunol.*, 2016, vol. 7: 60.
23. WHO. Influenza (Seasonal). 2016. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en> (04.12.2017)

Авторы:

Лосев И.В., научный сотрудник лаборатории иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Петухова Г.Д., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Исакова-Сивак И.Н., к.б.н., руководитель лаборатории иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Руденко Л.Г., д.б.н., заслуженный деятель науки РФ, руководитель отдела вирусологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Losev I.V., Researcher, Laboratory of Immunology and Viral Disease Prevention, Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Petukhova G.D., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Immunology and Viral Disease Prevention, Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Isakova-Sivak I.N., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Immunology and Viral Disease Prevention, Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Rudenko L.G., PhD, MD (Biology), Honored Worker of Science of the Russian Federation, Head of the Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 04.03.2018
 Отправлена на доработку 11.03.2019
 Принята к печати 14.03.2019

Received 04.03.2018
 Revision received 11.03.2019
 Accepted 14.03.2019

ИНДУКЦИЯ HCV-СПЕЦИФИЧЕСКОГО КЛЕТОЧНОГО ОТВЕТА *IN VITRO* ДЕНДРИТНЫМИ КЛЕТКАМИ, ГЕНЕРИРОВАННЫМИ В ПРИСУТСТВИИ ИНТЕРФЕРОНА- α

Е.Р. Черных, Е.А. Олейник, О.Ю. Леплина, М.А. Тихонова, Т.В. Тыринова, Н.М. Старостина, А.А. Останин

ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия

Резюме. Индукция сильного мультиэпитопного Т-клеточного ответа против вируса гепатита С (HCV) играет важную роль в элиминации вируса, тогда как недостаточность адаптивного ответа способствует хронизации и быстрой прогрессии HCV-инфекции. Поскольку дендритные клетки (DC) способны примировать наивные Т-лимфоциты и индуцировать эффективный иммунный ответ, использование DC-вакцин для усиления HCV-специфического Т-клеточного ответа рассматривается в качестве нового подхода к лечению хронического гепатита С (ХГС). В работе исследована способность DC, генерированных из моноцитов в присутствии интерферона- α и нагруженных рекомбинантными HCV белками Core (1–120) и NS3 (1192–1457), индуцировать антигенспецифический клеточный ответ у здоровых доноров и больных ХГС. Иммунный ответ оценивался по пролиферативной активности и продукции Th1 (IFN γ)/Th2 (IL-4, IL-6) цитокинов в культурах мононуклеарных клеток (МНК), а также активации цитотоксических Т-лимфоцитов в тесте дегрануляции. Проведенные исследования показали, что первичный антиген-специфический ответ в культурах МНК серонегативных доноров детектировался лучше при стимуляции DC, нагруженными одновременно двумя антигенами (DC_{Core/NS3}), чем при нагрузке одним белком. DC_{Core/NS3} индуцировали пролиферативный ответ и дегрануляцию CD8⁺ Т-клеток у всех тестируемых доноров и в 50% (5/10) случаев индуцировали продукцию IFN γ . Аналогично DC доноров, DC_{Core/NS3} пациентов с ХГС индуцировали в большинстве случаев (86%) пролиферативный ответ и в 57% случаев — продукцию IFN γ . В то же время активация цитотоксических Т-клеток у пациентов выявлялась реже (в 57% vs 100% у доноров), что могло быть отчасти обусловлено повышенной спонтанной дегрануляцией CD8⁺ Т-клеток у отдельных пациентов. Полученные данные обосновывают возможность использования DC-вакцин на основе интерферона- α -индуцированных DC с целью профилактики и лечения хронической HCV-инфекции.

Ключевые слова: HCV-инфекция, Т-клеточный ответ, Core-антиген, NS3-антиген, дендритные клетки.

INDUCTION OF HCV-SPECIFIC CELL RESPONSE *IN VITRO* BY DENDRITIC CELLS GENERATED WITH INTERFERON- α

Chernykh E.R., Oleynik E.A., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Tyrinova T.V., Starostina N.M., Ostanin A.A.

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. The induction of a strong multi-epitope T-cell response against hepatitis C virus (HCV) plays an important role in eliminating the virus, whereas adoptive response deficiency contributes to chronic and rapid progression of HCV-

Адрес для переписки:

Черных Елена Рэмовна
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14,
ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии.
Тел.: 8 (383) 236-03-29. Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: ct_lab@mail.ru

Contacts:

Elena R. Chernykh
630099, Russian Federation, Novosibirsk, Yadrincevskaya str., 14,
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology.
Phone: +7 (383) 236-03-29. Fax: +7 (383) 222-70-28.
E-mail: ct_lab@mail.ru

Библиографическое описание:

Черных Е.Р., Олейник Е.А., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Тыринова Т.В., Старостина Н.М., Останин А.А. Индукция HCV-специфического клеточного ответа *in vitro* дендритными клетками, генерированными в присутствии интерферона- α // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 1. С. 76–86. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-76-86

© Черных Е.Р. и соавт., 2019

Citation:

Chernykh E.R., Oleynik E.A., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Tyrinova T.V., Starostina N.M., Ostanin A.A. Induction of HCV-specific cell response *in vitro* by dendritic cells generated with interferon- α // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 76–86. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-76-86

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2019-1-76-86>

infection. Since dendritic cells (DCs) are capable of priming naive T lymphocytes and induce an effective immune response, the use of DC-based vaccines to enhance the HCV-specific T cell response is considered as a new approach to treatment of chronic hepatitis C (CHC). The ability of DCs generated from monocytes in the presence of interferon- α and loaded with recombinant HCV proteins Core (1–120) and NS3 (1192–1457) to induce an antigen-specific cellular response in healthy donors and patients with CHC was investigated. The immune response was assessed by proliferative activity and Th1 (IFN γ)/Th2 (IL-4, IL-6) production in mononuclear cells (MNC) cultures, and activation of cytotoxic T-lymphocytes in the degranulation test. We demonstrated that the primary antigen-specific response in MNC cultures of seronegative donors was detected better by stimulation of DCs, loaded with both antigens (DC_{Core/NS3}) than when loaded with a single protein. DC_{Core/NS3} induced the proliferative response and degranulation of CD8⁺ T cells in MNC cultures of all tested donors, and in 50% (5/10) cases — IFN γ production. Similarly to donor DCs, DC_{Core/NS3} of patients with CHC induced a proliferative response in most cases (86%) and IFN γ production in 57% cases. At the same time, the activation of cytotoxic T cells in patients was less frequent (patients vs donors 57 and 100%, respectively), which could be partly due to increased spontaneous degranulation of CD8⁺ T cells in some patients. The obtained data testify the possibility of using vaccines based on interferon- α -induced DCs for the prevention and treatment of chronic HCV infection.

Key words: chronic HCV infection, T cell response, Core-antigen, NS3-antigen, dendritic cells.

Введение

Инфекция, обусловленная вирусом гепатита С (HCV), остается важнейшей медико-социальной проблемой во всем мире в силу широкой распространенности и серьезных последствий. В большинстве случаев острая HCV-инфекция трансформируется в хроническую и является причиной цирроза печени, гепатоцеллюлярной карциномы и печеночной недостаточности [20, 23]. Наиболее эффективное лечение HCV-инфекции включает препараты интерферона- α (IFN α) в сочетании с рибавирином, однако и в этом случае ответ не превышает 40–50% у пациентов с генотипом 1, а развитие тяжелых побочных реакций часто вынуждает прекратить лечение [18]. Таргетная терапия ингибиторами протеаз, обещающая прорывом в лечении хронического вирусного гепатита С (ХГС), также имеет ряд ограничений [30].

Известно, что важную роль в элиминации вируса играет адаптивный Т-клеточный ответ. Несмотря на высокую вариабельность вирусного генома, вирус экспрессирует ряд высоко консервативных структурных и неструктурных белков [24], и сильный мультиспецифичный ответ Т-клеток к эпитопам консервативных белков ассоциирован с исходом острой HCV-инфекции в выздоровление. В то же время пациенты с ХГС характеризуются низким Т-клеточным ответом с узким репертуаром распознаваемых эпитопов [13]. Ведущую роль в уничтожении вируса играют CD8⁺ Т-клетки, цитотоксический эффект которых реализуется через продукцию IFN γ [29]. Не меньшая роль при HCV-инфекции отводится CD4⁺ Т-клеткам, которые обеспечивают костимуляторные сигналы для генерации цитотоксических Т-лимфоцитов. Выраженная пролиферация антигенспецифических CD4⁺ Т-клеток, а также продукция ими IFN γ сопряжены с эффективной элиминацией вируса при

острой инфекции [14, 28] и устойчивым вирусологическим ответом на терапию интерфероном и рибавирином при ХГС [9].

Недостаточность Т-клеточного ответа способствует не только хронизации, но и быстрой прогрессии HCV-инфекции [10] и во многом обусловлена нарушениями антигенной презентации и активации Т-клеток [21]. Наиболее эффективная презентация вирусных антигенов Т-лимфоцитам осуществляется дендритными клетками (DC) [5]. Подавление их функций вирусными белками является одним из механизмов, используемых вирусом для избегания иммунного ответа [26]. Поэтому применение DC, нагруженных вирусными антигенами, для стимуляции или усиления противовирусного иммунного ответа рассматривается в качестве новой терапевтической стратегии лечения HCV-инфекции [31]. Созданию такого подхода во многом способствовала разработка метода получения большого количества DC *in vitro* путем культивирования моноцитов с гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (GM-CSF) и интерлейкином-4 (IL-4). Генерированные таким образом DC (IL4-DC) при трансфекции HCV-антигенов продемонстрировали способность индуцировать антигенспецифический ответ в культурах Т-лимфоцитов здоровых доноров [16], а также больных ХГС [4]. Однако будучи эффективными в индукции пролиферативного ответа Core-специфических Т-клеток, IL4-DC не индуцировали значимой пролиферации NS3-специфических Т-клеток [17]. Кроме того, продукция IFN γ при стимуляции IL4-DC наблюдалась только при дополнительной трансфекции костимуляторной молекулы [4].

Наряду с IL-4 важную роль в дифференцировке моноцитов в DC играет IFN α [22]. Генерируемые в присутствии интерферона- α DC (IFN-DC) сохраняют высокую захватыва-

ую способность и характеризуются более высокой миграционной активностью; более эффективно индуцируют генерацию цитотоксических Т-клеток, распознающих вирусные антигены; обладают свойствами НК-клеток, а также характеризуются более высокой продукцией $IFN\alpha$ [6, 15]. Данный тип клеток может служить новой платформой для создания DC-вакцин, однако способность $IFN-DC$ индуцировать *in vitro* HCV-специфический ответ ранее не исследовалась. Учитывая, что полноразмерные HCV белки обладают иммуносупрессорной активностью [11], для нагрузки DC были выбраны усеченные фрагменты рекомбинантных HCV Core (1–120) и NS3 (1192–1457) антигенов. Нагрузка DC указанными белками согласно полученным ранее данным не оказывала ингибирующего действия на созревание и функции $IFN-DC$ [1].

Целью настоящего исследования стала оценка способности $IFN-DC$, нагруженных рекомбинантными Core- и NS3-антигенами, индуцировать антигенспецифический ответ в культурах мононуклеарных клеток здоровых доноров и больных ХГС.

Материалы и методы

В исследование были включены здоровые доноры, негативные по сывороточным маркерам вирусного гепатита С и больные ХГС (12 мужчин и 17 женщин) с генотипом 1b, умеренной вирусной нагрузкой ($RHK \geq 10^4$ МЕ/мл), минимальной или средней степенью активности гепатита по уровню трансаминаз крови, без трансформации в цирроз (фиброз 0–III по шкале METAVIR). Мононуклеарные клетки (МНК) получали центрифугированием гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фикола-верографина.

Генерация DC и нагрузка антигенами. Для генерации DC адгезивную к пластику фракцию МНК культивировали при 37°C в CO_2 -инкубаторе в течение 4 сут в 6-луночных планшетах (Nunclon, Дания) в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5 мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 5% сыворотки плодов коровы (FCS, Биолот, Санкт-Петербург), в присутствии GM-CSF (40 нг/мл, Sigma-Aldrich) и $IFN\alpha$ (1000 Ед/мл, Роферон-А, Roche, Швейцария) с последующим дозреванием в течение 24 ч с липополисахаридом (10 мкг/мл, ЛПС, *E. coli* 0114:B4, Sigma-Aldrich). Для нагрузки $IFN-DC$ использовали рекомбинантные протеины, кодируемые фрагментами генов иммунодоминантных районов белков Core (1–120) и NS3 (1192–1457) HCV генотипа 1b, полученные в лаборатории рекомбинантных белков ЗАО

«Вектор-Бест» (Новосибирск). Генерированные в 4-суточных культурах $IFN-DC$ инкубировали в течение 1 ч с рекомбинантными белками HCV Core и NS3 в дозе по 5 мкг/мл, после чего клетки однократно отмывали и индуцировали созревание добавлением ЛПС (10 мкг/мл на 24 ч).

Индукция антигенспецифического ответа. Антигенспецифический ответ стимулировали либо при культивировании МНК ($0,2 \times 10^6$ /лунку) в течение 5 сут с рекомбинантными HCV белками Core и/или NS3 в дозе 5 мкг/мл, либо при культивировании МНК в течение 5 сут с аутологичными $IFN-DC$ (в соотношении 10:1), нагруженными указанными антигенами. В первом случае контролем служили культуры МНК в отсутствие антигенов, во втором — МНК культивированные с DC, ненагруженными антигенами. Об индукции HCV-специфического клеточного ответа судили по усилению пролиферации, продукции Th1 ($IFN\gamma$) и Th2 (IL-4, IL-6) цитокинов и дегрануляции $CD8^+$ Т-клеток в присутствии рекомбинантных HCV белков или DC, нагруженных вирусными антигенами, по сравнению с контролем. Индекс стимуляции HCV Core- и/или NS3-белков или DC, нагруженных антигенами, рассчитывали как отношение ответа по сравнению с контрольными культурами.

Интенсивность пролиферации оценивали на 5 сутки радиометрически по включению 3H -тимидина, вносимого в лунки за 18 ч до конца культивирования в дозе 1 мКи/лунку.

Производство цитокинов ($IFN\gamma$, IL-4, IL-6) в супернатантах 5-суточных культур МНК, стимулированных Core/NS3-нагруженными DC или растворимыми Core/NS3-антигенами определяли методом иммуноферментного анализа, используя соответствующие тест-системы (Вектор-Бест, Новосибирск).

Активацию цитотоксических Т-клеток оценивали по дегрануляции $CD8^+$ Т-клеток методом проточной цитофлюориметрии. Известно, что стимуляция $CD8^+$ Т-лимфоцитов через Т-клеточный рецептор вызывает перемещение литических гранул из цитоплазмы к мембране и экстернализацию молекулы $CD107a$ (компонент литических гранул). Поэтому определение доли $CD8^+CD107a^+$ Т-лимфоцитов позволяет идентифицировать активированные цитотоксические Т-клетки. Для оценки дегрануляции $CD8^+$ Т-лимфоцитов в ответ на рекомбинантные антигены МНК ($0,2 \times 10^6$ /лунку) культивировали в течение 6 ч с монензимом А (BD PharMingen, США) в присутствии HCV антигенов (5 мкг/мл). Негативным контролем служили культуры МНК в отсутствие антигенов, позитивным контролем — культуры МНК, стимулированные анти- $CD3$ моноклональными антителами (ООО «Биоспектр», 1 мкг/мл).

Для оценки дегрануляции CD8⁺ Т-лимфоцитов, индуцированной антиген-нагруженными DC, МНК с DC (в соотношении 10:1) культивировали 5 сут, и за 6 ч до окончания культивирования вносили монензим А. Негативным контролем служили МНК культивированные с интактными IFN-DC. По завершении культивирования клетки метили анти-CD107a (APC) и анти-CD8(PE) антителами (BD PharMingen, США) и оценивали экспрессию CD107a в гейте CD3⁺CD8⁺-клеток на проточном цитофлуориметре (FACS Calibur, Becton Dickinson, США).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0. Данные представлены в виде среднего арифметического значения (*m*), медианных значений (*Me*), интерквартильного диапазона (*IQR*, 25–75% квантили) и минимальных (*Min*) и максимальных (*Max*) значений. Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни (*Pu*). Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Влияние рекомбинантных HCV белков на МНК серонегативных доноров

Поскольку для нагрузки IFN-DC использовали рекомбинантные HCV антигены, для исключения их неспецифических эффектов в предварительной серии экспериментов исследовали влияния Core- и NS3-антигенов на пролиферацию, продукцию IFN γ и активацию цитотоксических Т-клеток в культурах МНК серонегативных доноров (табл. 1). МНК доноров эффективно пролиферировали в ответ на стимуляцию митогеном КонА. В то же время

интенсивность пролиферации при стимуляции NS3- или Core-антигенами в дозе 5 мкг/мл, которая также использовалась для нагрузки DC, оставалась на уровне спонтанной пролиферации в контрольных культурах. Core- и NS3-антигены также не влияли на продукцию IFN γ , тогда как при КонА-стимуляции секреция IFN γ возрастала в среднем с 20 до 2750 пг/мл ($p_U < 0,01$). Относительное количество CD8⁺CD107a⁺-клеток в контрольных культурах было менее 1%, что свидетельствует о низком уровне спонтанной дегрануляции в популяции цитотоксических Т-лимфоцитов. При стимуляции анти-CD3 антителами содержание CD8⁺CD107a⁺ Т-клеток увеличивалось практически в 10 раз ($p_U < 0,01$). При этом NS3 или Core антигены не оказывали значимого влияния на количество CD8⁺CD107a⁺-клеток. Поскольку МНК серонегативных доноров не содержали примированных к HCV антигенам Т-клеток, отсутствие ответа МНК на Core- и NS3-антигены свидетельствовало, что исследуемые рекомбинантные белки не обладают неспецифической стимулирующей активностью.

HCV-специфический ответ, индуцированный IFN-DC здоровых доноров

Убедившись в отсутствии неспецифической активности используемых вирусных белков, далее исследовали способность IFN-DC доноров, нагруженных HCV-антигенами, индуцировать *in vitro* антигенспецифический ответ. Для этого у здоровых серонегативных доноров генерировали IFN-DC, которые затем нагружали Core (DC_{Core}), NS3 (DC_{NS3}) или их комбинацией (DC_{Core/NS3}) и культивировали в течение 5 дней с аутологичными МНК. Об индукции ответа судили по усилению пролиферации, продукции цитокинов (IFN γ , IL-4, IL-6) и де-

Таблица 1. Влияние HCV Core- и NS3-антигенов на пролиферацию, продукцию IFN γ и дегрануляцию цитотоксических Т-клеток в культурах МНК серонегативных доноров (n = 8–12)

Table 1. Effect of HCV Core and NS3 antigens on proliferation, IFN γ production and degranulation of cytotoxic T cells in PBMC cultures of seronegative donors (n = 8–12)

МНК PBMC		Пролиферация (имп./мин) Proliferation (cpm)	Продукция IFN γ (пг/мл) IFN γ production (pg/ml)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD107a ⁺ (%)
Контроль Control	Me	850	20	0,67
	IQR	340–1100	10–64	0,5–0,78
Core	Me	510	17,5	0,79
	IQR	240–1020	2–103	0,7–1,4
NS3	Me	750	20	0,56
	IQR	310–1050	2–51	0,35–1,0
ConA	Me	19 980*	2750*	–
	IQR	16 490–23 990	2420–2860	–
анти-CD3 anti-CD3	Me	–	–	6,3*
	IQR	–	–	4,4–6,9

Примечание. * — $p < 0,01$, различия статистически значимы по сравнению с контролем.

Note. * — $p < 0.01$, differences are statistically significant vs control.

грануляции CD8⁺ Т-клеток в культурах МНК при стимуляции DC, нагруженными вирусными антигенами, по сравнению с ответом МНК в присутствии интактных DC (DC₀).

Способность DC_{Core} и DC_{NS3} индуцировать антигенспецифический пролиферативный ответ была исследована у 6 доноров. По сравнению с интактными клетками IFN-DC, нагруженные отдельными HCV-антигенами, незначительно усиливали пролиферацию МНК в среднем на 11%. Медианные значения индексов стимуляции составляли 1,11 и 1,12 расч. ед. для DC_{Core} и DC_{NS3} соответственно (рис. 1А). Поскольку низкий уровень ответа был, очевидно, обусловлен малым количеством антигенраспознающих Т-клеток, в следующей серии экспериментов (n = 12) оценили пролиферативный ответ МНК, индуцированный IFN-DC, нагруженными двумя антигенами (DC_{Core/NS3}). В этом случае статистически значимое (p_U = 0,002) усиление пролиферации МНК отмечалось у всех 12 те-

стируемых доноров (рис. 1Б). Индекс стимуляции DC_{Core/NS3} составил 1,55 расч.ед. (IQR 1,17–2,05) и был достоверно выше аналогичных значений DC_{Core} (p_U = 0,05) или DC_{NS3} (p_U = 0,018). Учитывая полученные результаты, дальнейшие исследования были сфокусированы на эффектах IFN-DC, нагруженных комбинацией HCV-антигенов.

Поскольку одним из важнейших медиаторов противовирусного Т-клеточного ответа является IFN γ , была также исследована способность DC_{Core/NS3} стимулировать продукцию IFN γ (рис. 1В). Сами DC, культивируемые в соответствующих количествах (без МНК), не секретировали IFN γ на детектируемом уровне (данные не представлены). По сравнению с интактными клетками IFN-DC, нагруженные двумя HCV-антигенами, у 5 из 10 доноров не оказывали заметного влияния на продукцию IFN γ , тогда как в оставшихся 50% случаях статистически значимо усиливали его секрецию (p_U = 0,04).

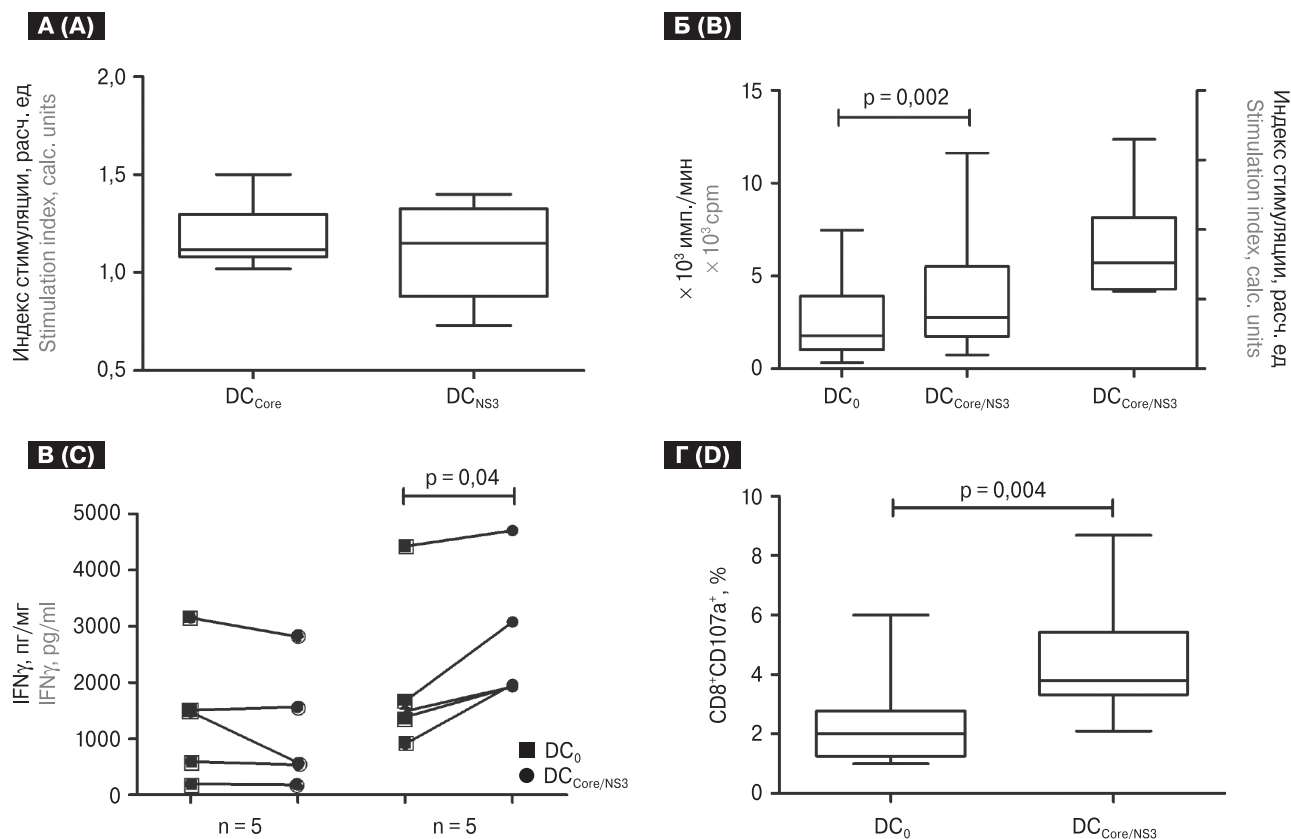


Рисунок 1. IFN-DC доноров, нагруженные вирусными антигенами, индуцируют антигенспецифический ответ

Figure 1. Donor IFN-DCs loaded with viral antigens induce an antigen-specific response *in vitro*

Примечания. DC₀ — интактные DC, DC_{Core} — DC, нагруженные Core-антигеном, DC_{NS3} — DC, нагруженные NS3-антигеном, DC_{Core/NS3} — DC, нагруженные Core- и NS3-антигенами. А, Б — пролиферация (n = 6, 12). В — продукция IFN γ (n = 10). Г — дегрануляция CD107a (n = 10). Данные представлены в виде среднего значения, интерквартильного диапазона, минимальных и максимальных значений.

Notes. DC₀ — intact DC, DC_{Core} — DC loaded with Core antigen, DC_{NS3} — DC loaded with NS3 antigen, DC_{Core/NS3} — DC loaded with Core and NS3 antigens. A, B — proliferation (n = 6, 12). C — IFN γ -production (n = 10). D — degranulation CD107a (n = 10). Data are presented as mean, interquartile and min-max ranges.

Индекс стимуляции DC_{Core/NS3} в этой подгруппе составил в среднем 1,4 расч.ед., варьируя от 1,1 до 2,16.

Наряду с оценкой продукции IFN γ , у части доноров (n = 4) было также исследовано влияние DC_{Core/NS3} на продукцию Th2 цитокинов (IL-6 и IL-4). Не было выявлено достоверных различий в уровне продукции IL-6/IL-4 в культурах МНК, стимулированных интактными IFN-DC и DC_{Core/NS3} (p_U > 0,05). Незначительное усиление секреции Th2 цитокинов регистрировалось только у одного из четырех тестируемых доноров.

Оценка способности IFN-DC индуцировать антигенспецифические цитотоксические Т-клетки показала (рис. 1Г), что по сравнению с интактными клетками DC_{Core/NS3} вызывали практически 2-кратное увеличение относительного содержания CD8⁺CD107a⁺ Т-клеток среди отвечающих аутологичных МНК (в среднем с 2 до 3,8%, p_U = 0,004). При этом индекс стимуляции DC_{Core/NS3} у всех 10 обследованных доноров превышал 1,3 расч.ед., что свидетельствует о способности IFN-DC, нагруженных HCV белками, примировать антигенспецифические цитотоксические Т-лимфоциты.

HCV-специфический ответ, индуцированный IFN-DC больных ХГС

Далее исследовали способность IFN-DC больных ХГС индуцировать HCV-специфический ответ в аутологичной смешанной куль-

туре лимфоцитов (ауто-СКЛ). Учитывая известные данные о снижении функциональной активности Т-лимфоцитов и возможной дефектности DC у пациентов с ХГС, предварительно была проведена сравнительная оценка митогенной реактивности Т-клеток и стимуляторной активности IFN-DC в ауто-СКЛ у здоровых доноров и больных ХГС. Из данных таблицы 2 видно, что по сравнению с донорами МНК больных отличались более низкой спонтанной пролиферацией (p_U = 0,02–0,15), а также сниженной митогенной реактивностью Т-клеток в КонА-стимулированных культурах (p_U = 0,008). Тем не менее, стимуляторная активность IFN-DC в ауто-СКЛ у больных ХГС сохранялась на уровне здоровых доноров (1980 vs 2050 имп./мин, p_U = 0,52).

Поскольку пролиферативный ответ в ауто-СКЛ отражает активацию Т-клеток в процессе распознавания HLA-DR антигенов на DC, можно заключить, что по своей антигенпрезентирующей активности IFN-DC больных ХГС были сопоставимы с DC доноров. Это позволило предположить, что DC больных, нагруженные рекомбинантными Core- и NS3-белками, также будут способны индуцировать *in vitro* клеточный ответ на вирусные антигены.

Для проверки высказанного предположения исследовали свойства DC_{Core/NS3} у 7 пациентов с ХГС (рис. 2). IFN-DC, нагруженные двумя HCV-антигенами, индуцировали пролиферативный ответ Т-лимфоцитов у 6 из 7 те-

Таблица 2. Сравнительная характеристика митогенной реактивности Т-клеток и стимуляторной активности IFN-DC доноров и больных ХГС

Table 2. Comparative characteristic of T cell mitogenic reactivity and IFN-DC stimulatory activity of healthy donors and patients with chronic hepatitis C

Параметры Characteristic	Доноры (n = 18) Donors	Больные (n = 29) Patients	P _U
Митогенная реактивность Т-клеток (имп./мин) T-cell mitogenic reactivity			
МНК PBMC	460 (320–550)	330 (250–420)	0,15
КонА ConA	21 800 (18 900–30 000)	12 400 (10 500–24 600)	0,008
ИСКонА (расч. ед) SIConA (calc. units)	63 (37–77)	41 (15–71)	0,09
Стимуляторная активность IFN-DC в ауто-СКЛ (имп./мин) IFNDC stimulatory activity in auto-MLC (cpm)			
МНК PBMC	480 (420–690)	240 (150–355)	0,02
МНК+DC PBMC +DC	2050 (1240–4060)	1980 (570–3960)	0,52
ИСDC (расч. ед) SIDC (calc. units)	4,5 (2,9–6,9)	8,1 (2,5–11,7)	0,16

Примечание. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (в скобках), p_U — достоверность различий между донорами и пациентами (U-критерий Манна–Уитни).

Note. Data are presented as median and interquartile range (in brackets), p_U — the significance of the differences between donors and patients (Mann–Whitney U-test).

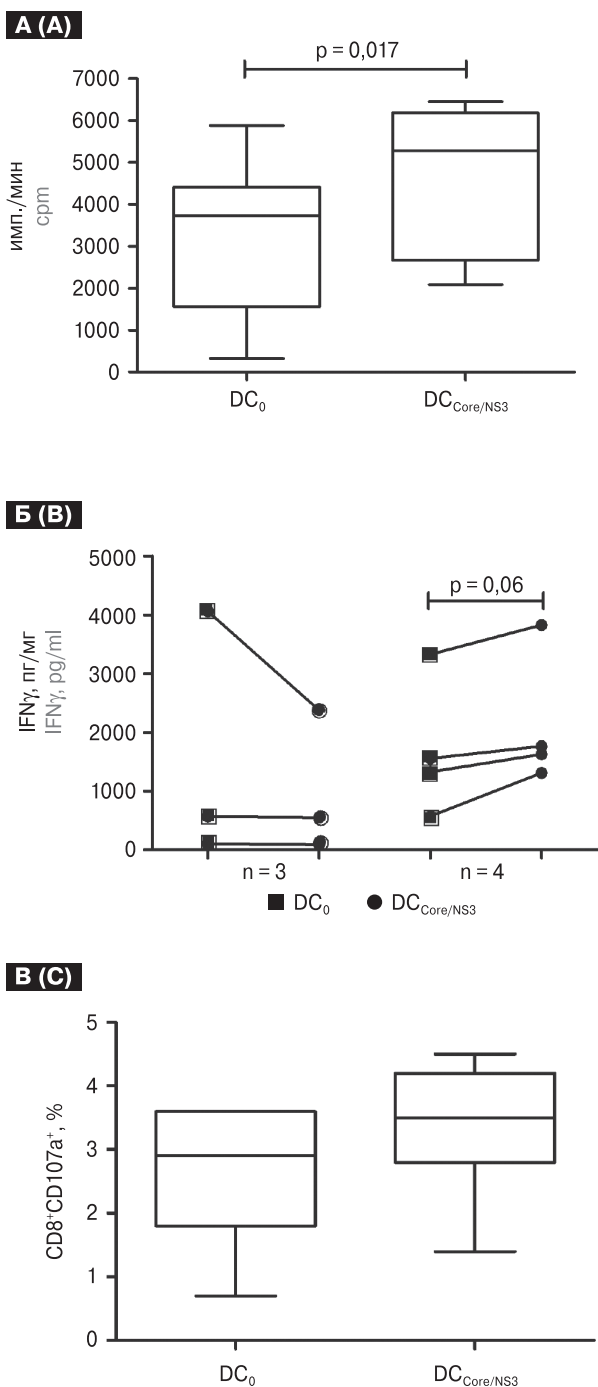


Рисунок 2. IFN-DC больных, нагруженные вирусными антигенами, индуцируют антигенспецифический ответ *in vitro*

Figure 2. Patient IFN-DCs loaded with viral antigens induce an antigen-specific response *in vitro*

Примечания. DC₀ — интактные DC, DC_{Core/NS3} — DC, нагруженные Core- и NS3-антигенами. А — пролиферация (n = 7); Б — продукция IFNγ (n = 7); В — дегрануляция CD107a (n = 7). Данные представлены в виде среднего значения, интерквартильного диапазона, минимальных и максимальных значений.

Notes. DC₀ — intact DC, DC_{Core/NS3} — DC loaded with Core and NS3 antigens. A — proliferation (n = 7); B — IFNγ-production (n = 7); C — degranulation CD107a (n = 7). Data are presented as mean, interquartile and min-max ranges.

стированных больных. Из данных рисунка 2А видно, что по сравнению с интактными клетками DC_{Core/NS3} статистически значимо усиливали пролиферацию в ауто-СКЛ ($p_U = 0,017$). При этом индекс стимуляции DC_{Core/NS3} составил в среднем 1,42 расч.ед. (IQR 1,37–1,72).

IFN-DC, нагруженные Core-/NS3-антигенами, стимулировали продукцию IFNγ у 4 из 7 тестируемых пациентов, но очевидно, из-за малой выборки данный эффект регистрировался в виде отчетливого тренда ($p_U = 0,06$). Индекс стимуляции DC_{Core/NS3} в этой подгруппе варьировал от 1,13 до 2,29 расч.ед. Так же как и у здоровых доноров DC_{Core/NS3} больных ХГС (n = 5) не влияли на уровень продукции Th2 цитокинов (IL-6, IL-4) в ауто-СКЛ. Индексы стимуляции DC_{Core/NS3} на секрецию IL-6 и IL-4 составили 1,08 и 0,93 расч.ед. соответственно.

В целом по группе DC_{Core/NS3} больных ХГС (n = 7) по сравнению с интактными DC₀ индуцировали незначительное возрастание относительного количества CD8⁺CD107a⁺ Т-клеток в ауто-СКЛ (рис. 2В). Тем не менее, на уровне индивидуальных значений значимая антигенспецифическая дегрануляция цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов выявлялась у 4 из 7 пациентов. Индекс стимуляции DC_{Core/NS3} в этой подгруппе варьировал от 1,3 до 6,0 расч.ед.

В таблице 3 представлены данные сравнительного анализа HCV-специфического клеточного ответа *in vitro* индуцированного, нагруженными вирусными Core- и NS3-антигенами, IFN-DC доноров и больных ХГС (табл. 3). Видно, по уровню пролиферативного ответа, а также по индексам стимуляции DC_{Core/NS3} пациентов и доноров значимо не различались. При этом DC больных индуцировали антигенспецифический пролиферативный ответ у большинства тестируемых пациентов (86%), то есть практически с такой же частотой, как и DC доноров. Активация Т-клеток к продукции IFNγ при стимуляции DC_{Core/NS3} больных ХГС регистрировалась с меньшей частотой, чем пролиферативный ответ (в 57% случаев). Однако такая же закономерность наблюдалась и для DC доноров. Поэтому частота IFNγ-секреторного ответа, индуцированного DC_{Core/NS3} в исследуемых группах, не различалась (57 vs 50%). Сравнение уровня продукции IFNγ и индексов стимуляции в группах «ответчиков» также не выявило значимых различий в стимуляторной активности DC_{Core/NS3} пациентов и доноров. При сравнении способности активировать антигенспецифические цитотоксические Т-клетки, DC пациентов стимулировали дегрануляцию CD8⁺ Т-клеток только в 57% случаев, тогда как DC доноров — в 100% случаев, что возможно объяснялось повышенной спонтанной дегрануляцией в культурах МНК ряда пациентов. Тем не менее,

индекс стимуляции DC_{Core/NS3} пациентов в группе «ответчиков» был сопоставим с донорскими значениями.

Обсуждение

Известно, что персистенция HCV-инфекции ассоциирована со слабым антигенспецифическим ответом CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов [29]. Поэтому разработка подходов к активации HCV-специфического Т-клеточного ответа остается актуальной задачей. Результаты настоящей работы продемонстрировали возможность индукции *in vitro* HCV-специфического ответа с помощью DC, генерированных с помощью интерферона- α и нагруженных рекомбинантными HCV Core (1–120) и NS3 (1192–1457) антигенами.

Исследования в культурах МНК серонегативных доноров (то есть в популяции, не содержащей HCV-примированных Т-клеток) показали, что антигенспецифический пролиферативный ответ индуцировался лучше при стимуляции DC доноров, нагруженных двумя антигенами (DC_{Core/NS3}), чем при нагрузке DC

одним белком (DC_{Core} или DC_{NS3}), что было очевидно связано с вовлечением большего количества антиген-распознающих Т-клеток. С другой стороны, этот факт свидетельствует, что используемые для нагрузки вирусные белки не оказывают взаимного ингибирующего действия на стимуляторную активность IFN-DC. Ингибирующий эффект HCV Core- и NS3-антигенов на DC является известным фактом, однако в большей степени характерен для полноразмерных белков (Core 2–191) или их фрагментов, расположенных ближе к 3'-концу РНК HVC (NS3 1450–1643) [3]. В то же время усеченный белок NS3 (1192–1457) не оказывал ингибирующего действия на аллостимуляторную активность IL4-DC, а супрессорный эффект Core 2–120 зависел от концентрации белка и зрелости DC [11, 27]. Проведенные нами ранее исследования в популяции IFN-DC, которые по сравнению с IL4-DC характеризуются промежуточной степенью зрелости и более стабильным фенотипом, показали, что нагрузка DC Core (1–120) и NS3 (1192–1457) антигенами не подавляла стимуляторной активности IFN-DC в алло-СКЛ [1].

Таблица 3. Сравнительная оценка антигенспецифического ответа МНК, индуцированного DC_{Core/NS3} доноров и больных ХГС

Table 3. Comparative assessment of the antigen-specific response of PBMCs induced by DC_{Core/NS3} of healthy donors and patients with chronic hepatitis C

Параметры Characteristic	Доноры Donors	Пациенты Patients
Пролиферация Proliferation		
– частота ответа (n/n) – frequency of response (n/n)	100% (12/12)	86% (6/7)
– имп./мин – cpm	2700 (1780–5360)	5290 (2670–6190)
– ИС (расч. ед.) – SI (calc. units)	1,55 (1,2–2,5)	1,42 (1,37–1,72)
Продукция IFNγ IFN γ production		
– частота ответа (n/n) – frequency of response (n/n)	50% (5/10)	57% (4/7)
– уровень IFN γ в группе «ответчиков» (пг/мл) – IFN γ level in the “responders” group (pg/ml)	1960 (1920–3080)	1690 (1470–2790)
– ИС в группе «ответчиков» (расч. ед.) – SI in the “responders” group (calc. units)	1,4 (1,31–1,84)	1,2 (1,14–1,75)
Дегрануляция CD8⁺ Т-клеток Degranulation CD8 ⁺ T-cells		
– частота ответа (n/n) – frequency of response (n/n)	100% (10/10)	57% (4/7)
– % CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD107a ⁺ Т-клеток – % CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD107a ⁺ T-cells	3,8 (3,5–4,9)	3,5 (2,8–4,2)
– ИС (расч. ед.) – SI (calc. units)	2,0 (1,6–2,3)	1,65 (1,33–3,97)

Примечание. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (в скобках).
Note. Data are presented as median and interquartile range (in brackets).

Настоящая работа является еще одним подтверждением отсутствия супрессорного эффекта выбранных рекомбинантных белков на функциональную активность IFN-DC, поскольку нагрузка IFN-DC данными антигенами не подавляла пролиферативный ответ аутологичных клеток и стимулирующий эффект при нагрузке DC двумя пептидами был выше, чем при нагрузке одним Core- или NS3-антигеном. Характеризуя первичный клеточный ответ на стимуляцию DC_{Core/NS3} доноров, следует отметить, что пролиферация антиген-реактивных клеток и дегрануляция антиген-специфических цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов индуцировалась в культурах МНК всех тестируемых доноров. В то же время усиление продукции IFN γ отмечалось в половине (5/10) случаев.

Способность DC доноров индуцировать *in vitro* HCV-специфический Т-клеточный ответ была впервые продемонстрирована Li W. с соавт., которые использовали DC, генерируемые из моноцитов в присутствии GM-CSF и IL-4 и трансфицированные HCV Core- и NS3-генами [17]. На выборке трех репрезентативных доноров было показано, что незрелые IL4-DC, со встроенными Core и NS3 генами, индуцировали в антиген-реактивных Т-клетках экспрессию мРНК TNF α , IL-2 и IL-4, а зрелые DC активировали экспрессию IFN γ , TNF α , IL12-p40, IL-6, IL-10 и, в меньшей степени, IL-4. Авторы также оценили пролиферативный ответ, который отмечался у всех трех доноров и был выше на Core-антиген, а также продукцию IFN γ , которая усиливалась у 2 из 3 доноров при стимуляции DC, экспрессирующими как Core-, так и NS3-антигены [16]. Позже было показано, что IL4-DC, нагруженные иммуногенными HCV пептидами, также могут индуцировать наивные Т-клетки к иммунному распознаванию, активации Th1 ответа и генерации эпитоп-специфических цитотоксических Т-клеток [7, 19]. Полученные нами результаты согласуются с данными других авторов о способности DC индуцировать антигенспецифический ответ в культурах МНК серонегативных доноров, а также впервые демонстрируют возможность использования для этих целей DC, генерируемых с помощью IFN α и нагруженных усеченными рекомбинантными белками HCV Core и NS3. При этом нами получены новые данные о меньшей стимуляторной активности DC_{Core/NS3} на продукцию IL-4/IL-6 по сравнению со способностью активировать секрецию IFN γ и их высокой способности к индукции цитотоксических Т-клеток. Эффективность IFN-DC, нагруженных усеченными HCV Core- и NS3-антигенами, может быть обусловлена большей эффективностью IFN-DC в кросс-презентации

длинноразмержных пептидов, презентации вирусных белков и индукции вирусспецифических цитотоксических Т-клеток [2, 8, 12, 25].

Исследования в группе больных ХГС (генотип 1в) показали, что несмотря на сниженную митогенную реактивность Т-клеток, IFN-DC пациентов обладали сохранной стимуляторной активностью и индуцировали в ауто-СКЛ такой же уровень пролиферативного ответа Т-лимфоцитов, как и DC доноров. Сравнительная оценка свойств DC_{Core/NS3} показала, что DC больных ХГС были сопоставимы с DC доноров по способности индуцировать пролиферативный ответ, который выявлялся в 86% случаев (vs 100% у доноров), а также продукцию IFN γ , которая усиливалась в 57% случаев (vs 50% у доноров). В то же время ответ цитотоксических Т-клеток при стимуляции DC_{Core/NS3} больных ХГС индуцировался реже, чем у доноров (57% vs 100%), что могло быть отчасти связано с повышенной спонтанной дегрануляцией CD8 Т-клеток у отдельных пациентов.

Echeverria I. с соавт. в группе 4 репрезентативных больных ХГС показали, что IL4-DC, трансфицированные NS3-антигеном и адапторной молекулой CFh40L (экто-домен CD40L), стимулируют NS3-специфический ответ аутологичных Т-клеток, который оценивался по количеству IFN γ продуцирующих клеток в ELISPOT тесте. Однако в отсутствии адапторной молекулы DC пациентов не стимулировали антигенспецифический ответ, что было, по мнению авторов, связано со снижением стимуляторной активности DC при HCV-инфекции и ее восстановлением после трансфекции CFh40L. Чтобы исключить неспецифический ответ на антигены трансфицированного аденовируса, авторы также оценили продукцию IFN γ в ответ на стимуляцию NS3 пептидами во вторичных культурах Т-клеток, подверженных экспансии с помощью IL-2, и продемонстрировали возрастание IFN γ у 2 из 4 пациентов [4].

Полученные нами результаты подтверждают возможность индукции *in vitro* антигенспецифического Т-клеточного ответа у больных ХГС. При этом поскольку в настоящей работе исследовались DC, генерируемые с помощью IFN α , и они не отличались от IFN-DC доноров по способности стимулировать пролиферацию аутологичных Т-лимфоцитов, активация HCV-реактивных Т-клеток не требовала дополнительной костимуляции.

Проведенное исследование имеет ряд ограничений. Так, пролиферативная активность и продукция цитокинов оценивалась нами в виде валовых показателей, а не на уровне одной клетки. Это не позволило оценить вклад отдельных субпопуляций (CD4⁺ и CD8⁺) HCV-

реактивных клеток в иммунном ответе, а также охарактеризовать гетерогенность антиген-специфических клеток по их функциональной активности. Тем не менее, поскольку используемые рекомбинантные вирусные антигены в предварительном тестировании не показали прямого неспецифического стимулирующего действия на функции МНК серонегативных доноров, то возрастание пролиферации, продукции IFN γ и дегрануляции цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов в культурах МНК с DC_{Core/NS3}

по сравнению с ответом в присутствии интактных DC, свидетельствовало об антигенспецифическом характере ответа, что в итоге и позволило оценить *in vitro* HCV-специфический клеточный ответ.

В целом данные о способности IFN-DC доноров и больных ХГС примировать и активировать Т-клетки, специфические к HCV антигенам, обосновывают перспективы использования DC-вакцин для стимуляции иммунного ответа при хронической HCV-инфекции.

Список литературы/References

1. Олейник Е.А., Леплина О.Ю., Тыринова Т.В., Тихонова М.А., Пыринова Г.Б., Останин А.А., Старостина Н.М., Черных Е.Р. Влияние рекомбинантных белков Core и NS3 вируса гепатита С на созревание и функции дендритных клеток, генерируемых *in vitro* в присутствии интерферона-альфа // Иммунология. 2016. Т. 37, № 5. С. 239–245. [Oleynik E.A., Leplina O.Yu., Tyrinova T.V., Tikhonova M.A., Pyrinova G.B., Ostanin A.A., Starostina N.M., Chernykh E.R. The influence of recombinant HCV proteins Core and NS3 on maturation and functions of dendritic cells generated *in vitro* with interferon-alpha. *Immunologiya = Immunology (Russia)*, 2016, vol. 37, no. 5, pp. 239–245. doi: 10.18821/0206-4952-2016-37-5-239-245 (In Russ.)]
2. Carbonneil C., Aouba A., Burgard M., Cardinaud S., Rouzioux C., Langlade-Demoyen P., Weiss L. Dendritic cells generated in the presence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IFN-alpha are potent inducers of HIV-specific CD8 T cells. *AIDS*, 2003, vol. 17, no. 12, pp. 1731–1740. doi: 10.1097/01.aids.0000076306.76477.15
3. Dolganic A., Kodys K., Kopasz A., Marshall C., Do T., Romics L. Jr., Mandrekar P., Zapp M., Szabo G. Hepatitis C virus core and nonstructural protein 3 proteins induce proinflammatory cytokines and inhibit dendritic cell differentiation. *J. Immunol.*, 2003, vol. 170, no. 11, pp. 5615–5624. doi: 0.4049/jimmunol.170.11.5615
4. Echeverria I., Pereboev A., Silva L., Zabaleta A., Riezu-Boj J.I., Bes M., Cubero M., Borrás-Cuesta F., Lasarte J.J., Esteban J.I., Prieto J., Sarobe P. Enhanced T cell responses against hepatitis C virus by *ex vivo* targeting of adenoviral particles to dendritic cells. *Hepatology*, 2011, vol. 54, no. 1, pp. 28–37. doi: 10.1002/hep.24325
5. Eickhoff S., Brewitz A., Gerner M.Y., Klauschen F., Komander K., Hemmi H., Garbi N., Kaisho T., Germain R.N., Kastentmüller W. Robust anti-viral immunity requires multiple distinct T cell-dendritic cell interactions. *Cell*, 2015, vol. 162, no. 6, pp. 1322–1337. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.004
6. Gessani S., Conti L., Del Corno M., Belardelli F. Type I interferons as regulators of human antigen presenting cell functions. *Toxins (Basel)*, 2014, vol. 6, no. 6, pp. 1696–1723. doi: 10.3390/toxins6061696
7. Guo Z., Zhang H., Rao H., Jiang D., Cong X., Feng B., Wang J., Wei L., Chen H. DCs pulsed with novel HLA-A2-restricted CTL epitopes against hepatitis C virus induced a broadly reactive anti-HCV-specific T lymphocyte response. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 6: e38390. doi: 10.1371/journal.pone.0038390
8. Jin Z., Fan J., Zhang Y., Yi Y., Wang L., Yin D., Deng T., Ye W. Comparison of morphology, phenotypes and function between cultured human IL4DC and IFNDC. *Mol. Med. Rep.*, 2017, vol. 16, no. 5, pp. 345–354. doi: 10.3892/mmr.2017.7581
9. Kamal S.M., Fehr J., Roesler B., Peters T., Rasenack J.W. Peginterferon alone or with ribavirin enhances HCV-specific CD4 T-helper 1 responses in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, 2002, vol. 123, no. 4, pp. 1070–1083. doi: 10.1053/gast.2002.36045
10. Koziel M.J. Cellular immune responses against hepatitis C virus. *Clin. Infect. Dis.*, 2005, vol. 41, no. 1, pp. 25–31. doi: 10.1086/429492
11. Krishnadas D.K., Ahn J.S., Han J., Kumar R., Agrawal B. Immunomodulation by hepatitis C virus-derived proteins: targeting human dendritic cells by multiple mechanisms. *Int. Immunol.*, 2010, vol. 22, no. 6, pp. 491–502. doi: 10.1093/intimm/dxq033
12. Lapenta C., Santini S.M., Spada M., Donati S., Urbani F., Accapezzato D., Franceschini D., Andreotti M., Barnaba V., Belardelli F. IFN-alpha-conditioned dendritic cells are highly efficient in inducing cross-priming CD8(+) T cells against exogenous viral antigens. *Eur. J. Immunol.*, 2006, vol. 36, no. 8, pp. 2046–2060. doi: 10.1002/eji.200535579
13. Lauer G.M., Barnes E., Lucas M., Timm J., Ouchi K., Kim A.Y., Day C.L., Robbins G.K., Casson D.R., Reiser M., Dusheiko G., Allen T.M., Chung R.T., Walker B.D., Klenerman P. High resolution analysis of cellular immune responses in resolved and persistent hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*, 2004, vol. 127, no. 3, pp. 924–936. doi:10.1053/j.gastro.2004.06.015
14. Lechner F., Wong D.K., Dunbar P.R., Chapman R., Chung R.T., Dohrenwend P., Robbins G., Phillips R., Klenerman P., Walker B.D. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J. Exp. Med.*, 2000, vol. 191, no. 9, pp. 1499–1512. doi: 10.1084/jem.191.9.1499
15. Leplina O.Y., Tyrinova T.V., Tikhonova M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Interferon alpha induces generation of semi-mature dendritic cells with high pro-inflammatory and cytotoxic potential. *Cytokine*, 2015, vol. 71, no. 1, pp. 1–7. doi: 10.1016/j.cyt.2014.07.258
16. Li W., Krishnadas D.K., Li J., Tyrrell D.L., Agrawal B. Induction of primary human T cell responses against hepatitis C virus-derived antigens NS3 or core by autologous dendritic cells expressing hepatitis C virus antigens: potential for vaccine and immunotherapy. *J. Immunol.*, 2006, vol. 176, no. 10, pp. 6065–6075. doi: 10.4049/jimmunol.176.10.6065
17. Li W., Li J., Tyrrell D.L., Agrawal B. Expression of hepatitis C virus (HCV) derived Core or NS3 antigens in human dendritic cells leads to induction in pro-inflammatory cytokines and normal T cell stimulation capabilities. *J. Gen. Virol.*, 2006, vol. 87, pp. 61–72. doi: 10.1099/vir.0.81364-0

18. Manns M.P., Wedemeyer H., Cornberg M. Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut*, 2006, vol. 55, no. 9, pp. 1350–1359. doi: 10.1136/gut.2005.076646
19. Mishra S., Losikoff P.T., Self A.A., Terry F., Ardito M.T., Tassone R., Martin W.D., De Groot A.S., Gregory S.H. Peptide-pulsed dendritic cells induce the hepatitis C viral epitope-specific responses of naive human T cells. *Vaccine*, 2014, vol. 32, no. 26, pp. 3285–3292. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.03.083
20. Mohd Hanafiah K., Groeger J., Flaxman A.D., Wiersma S.T. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology*, 2013, vol. 57, no. 4, pp. 1333–1334. doi: 10.1002/hep.26141
21. Neumann-Haefelin C., Blum H.E., Chisari F.V., Thimme R. T cell response in hepatitis C virus infection. *J. Clin. Virol.*, 2004, vol. 32, no. 2, pp. 75–85. doi: 10.1016/j.jcv.2004.05.008
22. Paquette R.L., Hsu N.C., Kiertscher S.M., Park A.N., Tran L., Roth M.D., Glaspy J.A. Interferon-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor differentiate peripheral blood monocytes into potent antigen-presenting cells. *J. Leukoc. Biol.*, 1998, vol. 64, no. 3, pp. 358–367. doi: 10.1002/jlb.64.3.358
23. Petruzzello A., Marigliano S., Loquercio G., Cozzolino A., Cacciapuoti C. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: an up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J. Gastroenterol.*, 2016, vol. 22, no. 34, pp. 7824–7840. doi: 10.3748/wjg.v22.i34.7824
24. Rispeter K., Lu M., Behrens S.E., Fumiko C., Yoshida T., Roggendorf M. Hepatitis C virus variability: sequence analysis of an isolate after 10 years of chronic infection. *Virus Genes*, 2000, vol. 21, no. 3, pp. 179–188.
25. Ruben J.M., Bontkes H.J., Westers T.M., Hooijberg E., Ossenkoppele G.J., de Gruijl T.D., van de Loosdrecht A.A. Differential capacity of human interleukin-4 and interferon- α monocyte-derived dendritic cells for cross-presentation of free versus cell-associated antigen. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2015, vol. 64, no. 11, pp. 1419–1427. doi: 10.1007/s00262-015-1741-1
26. Sachdeva M., Chawla Y.R., Arora S.R. Dendritic cells: the warriors upfront-turned defunct in chronic hepatitis C infection. *World J. Hepatol.*, 2015, vol. 7, no. 19, pp. 2202–2208. doi: 10.4254/wjh.v7.i19.2202
27. Saito K., Ait-Goughoulte M., Truscott S.M., Meyer K., Blazevic A., Abate G., Ray R.B., Hoft D.F., Ray R. Hepatitis C virus inhibits cell surface expression of HLA-DR, prevents dendritic cell maturation, and induces interleukin-10 production. *J. Virol.*, 2008, vol. 82, no. 7, pp. 3320–3328. doi: 10.1128/JVI.02547-07
28. Schulze zur Wiesch J., Lauer G.M., Day C.L., Kim A.Y., Ouchi K., Duncan J.E., Wurcel A.G., Timm J., Jones A.M., Mothe B., Allen T.M., McGovern B., Lewis-Ximenez L., Sidney J., Sette A., Chung R.T., Walker B.D. Broad repertoire of the CD4+ Th cell response in spontaneously controlled hepatitis C virus infection includes dominant and highly promiscuous epitopes. *J. Immunol.*, 2005, vol. 175, no. 6, pp. 3603–3613. doi: 10.4049/jimmunol.175.6.3603
29. Thimme R., Bukh J., Spangenberg H.C., Wieland S., Pemberton J., Steiger C., Govindarajan S., Purcell R.H., Chisari F.V. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, vol. 99, no. 24, pp. 15661–15668. doi: 10.1073/pnas.202608299
30. Wilby K.J., Partovi N., Ford J.A., Greanya E., Yoshida E.M. Review of boceprevir and telaprevir for the treatment of chronic hepatitis C. *Can. J. Gastroenterol.*, 2012, vol. 26, no. 4, pp. 205–210. doi: 10.1155/2012/751057
31. Zhou Y., Zhang Y., Yao Z., Moorman J.P., Jia Z. Dendritic cell-based immunity and vaccination against hepatitis C virus infection. *Immunology*, 2012, vol. 136, no. 4, pp. 385–396. doi: 10.1111/j.1365-2567.2012.03590.x

Авторы:

Черных Е.Р., д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, зав. лабораторией клеточной иммунотерапии ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия;

Олейник Е.А., аспирант лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия;

Леплина О.Ю., д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия;

Тихонова М.А., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия;

Тыринова Т.В., к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия;

Старостина Н.М., заслуженный врач РФ, к.м.н., зав. отделением иммунологии Клиники иммунопатологии ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия;

Останин А.А., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия.

Authors:

Chernykh E.R., RAS Corresponding Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation;

Oleynik E.A., Postgraduate Student, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation;

Leplina O.Yu., PhD, MD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation;

Tikhonova M.A., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation;

Tyrinova T.V., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation;

Starostina N.M., Honored Doctor of Russian Federation, PhD (Medicine), Head of the Immunology Department, Clinics of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation;

Ostanin A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation.

СОЗРЕВАНИЕ *IN VITRO* ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ЗДОРОВЫХ ЛИЦ И ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ, ВЫЗВАННЫМ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Ю.П. Рубцова, Д.Я. Алейник, О.П. Живцов, В.Н. Митрофанов

ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет МЗ РФ, Нижний Новгород, Россия

Резюме. В работе представлены результаты сравнительного исследования созревания дендритных клеток, выделенных из мононуклеаров периферической крови, здоровых добровольцев и пациентов с хроническим остеомиелитом. У всех пациентов был выделен *Staphylococcus aureus*. Для созревания дендритные клетки культивировали при стандартных условиях в ростовой среде (RPMI-1640, антибиотики, L-глутамин, 15% телячья эмбриональная сыворотка) в присутствии интерлейкина-4 и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора с последующим добавлением коктейля стимуляторов, включавшего интерлейкин-1 β , фактор некроза опухоли- α , интерлейкин-6, простагландин E2. Визуальные характеристики дендритных клеток в процессе созревания определяли с помощью инвертированного микроскопа Zeiss ODSERVER.Z1 с программой визуализации изображений AxioVision Rel.4.8, используя световую и фазово-контрастную микроскопию при увеличении $\times 40$, $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$, $\times 630$. Определение иммунофенотипа дендритных клеток проводили с использованием панели моноклональных антител: CD80FITC, CD86 (B7–2)PE, HLA-DR PC7 (Beckman Coulter, США), CD14PerCP-Cy5.5, CD83APC, CD40PE-Cy7 (Becton Dickinson, США) с соответствующими изотипическими контролями на цитофлуориметре FACS Canto II (Becton Dickinson, США). Показано, что в процессе созревания дендритные клетки пациентов, так и у условно здоровых доноров, увеличиваются в размерах и приобретают отростчатую форму. Экспрессия CD86, CD83, CD80, CD40 у пациентов с хроническим остеомиелитом выражена ниже, чем экспрессия соответствующих маркеров у условно здоровых добровольцев. После стимуляции дендритных клеток пациентов с остеомиелитом достоверно увеличивается процент клеток CD83⁺ и клеток, несущих костимулирующие молекулы CD86, CD80, CD40. По мере созревания различия, выявленные при исследовании незрелых клеток здоровых добровольцев и пациентов с остеомиелитом, исчезают, и на 10 сут уровень экспрессии ключевых маркеров оказывается на близких по значениям уровнях. При этом экспрессия основного маркера дифференцировки CD83 и костимулирующей молекулы CD80 у пациентов с остеомиелитом увеличивается интенсивнее, чем у здоровых. Таким образом, способность дендритных клеток, выделенных из моноцитов периферической крови, пациентов с хроническим остеомиелитом, вызванным *Staphylococcus aureus*, к созреванию под влиянием активаторов *in vitro* не нарушена. Полученные результаты открывают возможность использования дендритных клеток в качестве естественного, замещающего адъювант компонента при разработке вакцин для лечения хронического остеомиелита.

Ключевые слова: хронический остеомиелит, *Staphylococcus aureus*, дендритные клетки, созревание, фенотипирование, CD-рецепторы.

Адрес для переписки:

Рубцова Юлия Павловна
603950, Россия, Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1,
ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский
университет МЗ РФ.
Тел.: 8 (831) 436-66-35 (служебн.); 8 (905) 192-89-77 (моб.).
Факс: 8 (831) 439-01-84.
E-mail: rubincherry@yandex.ru

Contacts:

Julia P. Rubtsova
603950, Russian Federation, Nizhny Novgorod, Minin
and Pozharsky sq., 10/1, Privolzhsky Research Medical University.
Phone: +7 (831) 436-66-35 (office); +7 (905) 192-89-77 (mobile).
Fax: +7 (831) 439-01-84.
E-mail: rubincherry@yandex.ru

Библиографическое описание:

Рубцова Ю.П., Алейник Д.Я., Живцов О.П., Митрофанов В.Н.
Созревание *in vitro* дендритных клеток здоровых лиц и пациентов
с хроническим остеомиелитом, вызванным *Staphylococcus aureus* //
Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 1. С. 87–94. doi: 10.15789/2220-
7619-2019-1-87-94

© Рубцова Ю.П. и соавт., 2019

Citation:

Rubtsova J.P., Aleynik D.Ya., Zhivtsov O.P., Mitrofanov V.N. *In vitro*
dendritic cell maturation isolated from healthy people and patients with
Staphylococcus aureus caused chronic osteomyelitis // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 1,
pp. 87–94. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-87-94

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2019-1-87-94>

IN VITRO DENDRITIC CELL MATURATION ISOLATED FROM HEALTHY PEOPLE AND PATIENTS WITH STAPHYLOCOCCUS AUREUS-CAUSED CHRONIC OSTEOMYELITIS

Rubtsova J.P., Aleynik D.Ya., Zhivtsov O.P., Mitrofanov V.N.

Privolzhsky Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Abstract. Here we present the data comparing maturation of peripheral blood mononuclear cell-derived dendritic cells (DCs) isolated from healthy volunteers and *Staphylococcus aureus*-positive patients with chronic osteomyelitis. Dendritic cells were cultured in a standard maturation cell medium (RPMI-1640, supplemented with antibiotics, L-glutamine, 15% calf embryonic serum) added with interleukin-4 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, followed by adding a stimulating factor cocktail containing interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α , interleukin-6, and prostaglandin E2. Dendritic cell maturation was analyzed by estimating visual characteristics under Zeiss ODSERVER.Z1 inverted microscope using Axiovision Rel.4.8 imaging software as well as light and phase-contrast microscopy at magnification of $\times 40$, $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$, $\times 630$. Dendritic cell immunophenotyping was carried out by using a panel of anti-human monoclonal antibodies: anti-CD80 FITC-conjugated, anti-CD86 (B7-2) PE-conjugated, anti-HLA-DR PC7-conjugated (all from Beckman Coulter, USA), anti-CD14 PerCP-Cy5.5-conjugated, anti-CD83 APC-conjugated, anti-CD40 PE-Cy7-conjugated (Becton Dickinson, USA) as well as isotype-matched control antibodies on the FACS Canto II flow cytometer (Becton Dickinson, USA). It was shown that while maturation dendritic cells derived both from patients or volunteers increased in size and underwent dendrite formation. Moreover, expression of CD86, CD83, CD80, and CD40 markers on dendritic cells derived from patients vs. volunteers was lowered. However, DC stimulation resulted in significantly increased percentage of DCs positive for CD83 DCs co-stimulation molecules CD86, CD80, CD40 chronic osteomyelitis. However, such differences found in immature DCs in both groups disappeared upon maturation, so that expression of the key markers on day 10 was maintained at close level. In particular, expression of CD83 differentiation marker and the CD80 co-stimulation molecule on DCs from patients vs. volunteers was increased stronger. Thus, a maturation potential in DCs isolated from patients with *Staphylococcus aureus*-caused chronic osteomyelitis was not impaired *in vitro*. The data obtained open up an opportunity to use dendritic cells as a natural adjuvant-substituting component for development of individualized vaccines in treatment and prevention of recurrent chronic osteomyelitis.

Key words: chronic osteomyelitis, *Staphylococcus aureus*, dendritic cells, maturation, phenotyping, CD-receptors.

Введение

Хронический остеомиелит — тяжелое заболевание с рецидивирующим течением, составляющее до 44% всех гнойно-некротических заболеваний конечностей. При открытых переломах трубчатых костей частота развития травматического остеомиелита по данным различных авторов составляет от 2 до 51%, при огнестрельных переломах от 9 до 90%, а после остеосинтеза закрытых переломов длинных костей от 0,2 до 12% [1, 11, 22]. В 35–37,8% случаев хронический остеомиелит приводит к инвалидизации пострадавших [5].

Несмотря на использование активной хирургической тактики и мощной антибиотикотерапии, за последние годы практически не отмечается улучшения результатов лечения и сокращения количества рецидивов у пациентов с хроническим остеомиелитом, которые после оперативного лечения составляют до 34,8% [10, 18]. Тяжесть заболевания, высокий процент рецидивов, отсутствие эффекта от существующей терапии заставляют искать дополнительные подходы к терапии остеомиелитического процесса, основанные на патогенетических механизмах его развития.

Можно предполагать, что существенную роль в патогенезе хронического остеомиелита

играет как исходная иммунокомпрометированность пострадавших, так и длительная персистенция возбудителя, приводящая к многочисленным изменениям в системе иммунитета.

Исследования, посвященные характеру иммунологических сдвигов при хроническом остеомиелите, не очень многочисленны и достаточно противоречивы. Продемонстрированы разнонаправленные отклонения в составе основных популяций лимфоцитов периферической крови: Т-клеток, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и НК-клеток, обнаружены сдвиги в системе гуморального иммунитета и дисфункция фагоцитарного звена [7, 8, 19, 30, 31, 32]. Указанные данные характеризуют изменения как в системе адаптивного, так и в системе врожденного иммунитета.

В настоящее время известно, что существенное значение для обеспечения необходимой взаимосвязи между системами врожденного и адаптивного иммунного ответа, обеспечения их функционального единства играют дендритные клетки (DC) [23]. Они связаны с окружающей средой через многочисленные молекулярные сенсоры, позволяющие захватывать чужеродные антигены и передавать полученную информацию лимфоцитам. DC специализированные и наиболее мощные антигенпрезентирующие клетки (АПК), с помощью которых

можно получить направленный иммунный ответ [20]. DC происходят из стволовых кровяных клеток и представляют собой гетерогенную группу антигенпрезентирующих клеток [27], среди которых у человека выделяют две основные подгруппы: плазмоцитоидные и классические или обычные DC. В периферической крови преобладают классические DC, которые составляют, как правило, до 90% всех DC. Классические DC рассеяны по лимфоидным и нелимфоидным тканям, мигрируют по лимфатическим сосудам и с током крови. Эти клетки характеризуются выраженной способностью к сбору и презентации антигенов и отличаются по степени зрелости, выделяют незрелые и зрелые DC. Незрелые DC присутствуют в различных тканях и характеризуются высоким эндоцитозом при незначительной экспрессии молекул адгезии и костимулирующих молекул. Поэтому, незрелые DC активно захватывают антигены, но обладают низкой способностью к их представлению. В присутствии факторов созревания эти клетки превращаются в зрелые дендритные клетки.

Зрелые DC отличаются наличием множества отростков, увеличивающих их поверхность и способность к активному передвижению; низкой адгезией к пластику; низкой способностью к эндоцитозу и низкой экспрессией рецепторов для захвата антигенов при высокой экспрессии костимулирующих молекул и молекул адгезии. Зрелые DC являются единственными клетками, которые способны представлять наивным Т-клеткам неизвестные для них ранее антигены, и, в отличие от других антигенпрезентирующих клеток, их стимулирующий эффект на Т-лимфоциты в 10–100 раз сильнее [2, 4].

Полученные данные о взаимодействии антигенпредставляющей клетки, антигена, иммунных структур, уже несколько десятилетий используются для создания дендритноклеточных вакцин, направленных на борьбу с различными хроническими заболеваниями. Проведено большое количество доклинических исследований, в ходе которых были использованы разнообразные способы нагрузки и стимуляции дендритных клеток антигенами *in vitro*. Результаты этой работы в настоящее время применяются в практической медицине для борьбы с хронически текущими процессами, в частности для терапии онкологических заболеваний [16, 20, 24, 25, 28, 34, 35], туберкулеза [12, 15, 21]. Учитывая центральную роль DC как профессиональных и сверхэффективных АПК, представляется перспективным исследование возможности использования их в качестве естественного, замещающего адъювант компонента вакцин при хроническом остеомиелите.

Вместе с тем способность DC, выделенных из моноцитов периферической крови пациентов при этой патологии, к созреванию *in vitro* практически не изучена.

Цель работы: изучить особенности фенотипического созревания DC, выделенных из моноцитов периферической крови пациентов с хроническим остеомиелитом, по сравнению с особенностями созревания DC здоровых добровольцев.

Материалы и методы

Группы обследованных. В работе использовали материал от 6 пациентов с хроническим гнойным остеомиелитом (4 мужчины, 2 женщины) и 6 условно здоровых добровольцев (2 мужчины, 4 женщины). В обеих группах преобладали пациенты работоспособного возраста: в группе пациентов с хроническим гнойным остеомиелитом возраст пациентов колебался от 37 до 67 лет, в группе условно здоровых доноров — от 27 до 51 года.

Все пациенты проходили хирургическое лечение в отделении гнойной хирургии университетской клиники ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России по поводу обострения хронического остеомиелита. Длительность остеомиелитического процесса составляла от 1 года до 7 лет, и у всех пациентов гнойно-воспалительный процесс сопровождался полостными дефектами костной ткани. У каждого пациента из раневого отделяемого был выделен *Staphylococcus aureus*. Пациенты поступали в фазе обострения, и до начала специфической терапии у них забирали кровь для анализа. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России и утвержден Ученым советом. Каждый человек, включенный в исследование, представил добровольное информированное согласие.

Выделение моноклеаров. Кровь забирали в вакутайнеры с раствором ЭДТА в общем объеме по 20–50 мл у каждого исследуемого, разводили 1 : 1 фосфатно-солевым буфером (PBS) и использовали для выделения моноклеаров периферической крови. Выделение моноклеарной фракции проводили путем градиентного центрифугирования на фиколл-урографинном градиенте ($\rho = 1.077$) при 400g в течение 40 мин. После выделения собирали интерфазные кольца и трижды отмывали PBS, ресуспендировали в ростовой среде RPMI-1640 с добавлением 15% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) (ПанЭко, Москва, Россия), антибиотиков (пенициллин/стрептомицин), глутамин (ПанЭко, Москва, Россия). Подсчитывали концентрацию и жизнеспособность клеток с помощью счетчика клеток «Countes» (Invitrogen, США).

Выделение DC из моноцитов. Для выделения DC из моноцитов периферической крови и оценки их способности к созреванию и дифференцировке в условиях *in vitro* клетки полученной суспензии засеивали с концентрацией 4–4,5 млн в 1 мл ростовой среды на лунку 24-луночного планшета (Corning, США). После посева клетки инкубировали в течение двух часов при t 37°C, 5% CO₂, в увлажненной атмосфере. По окончании инкубации отбрасывали не прилипшие клетки, а к адгезированным на пластике моноцитам добавляли новую ростовую среду, содержащую антибиотики, глутамин, 15% FBS (ПанЭко, Москва, Россия), IL-4 в концентрации 20 нг/мл и GM-CSF в концентрации 100 нг/мл (Sigma-Aldrich, Германия). Планшеты с прикрепившимися клетками культивировали в течение 3 сут при 37°C и 5% CO₂. На третьи сутки культивирования в каждую лунку добавляли еще IL-4 и GM-CSF в той же концентрации без смены среды. Для терминальной дифференцировки на седьмые сутки в контрольных лунках меняли среду RPMI-1640 с добавлением 15% FBS сыворотки (ПанЭко, Москва, Россия), а в опытных лунках при смене среды кроме 15% FBS добавляли коктейль стимуляторов (IL-1 β , TNF α , IL-6, простагландин E₂ (PGE₂) (Sigma-Aldrich, Германия) и оставляли культивировать еще на 48 ч. После активации через 48 ч клетки смывали осторожным пипетированием и с контрольных, и с опытных лунок. Подсчитывали концентрацию и жизнеспособность клеток в каждой группе, используя счетчик клеток «Countess» (Invitrogen, США). Осаждали их центрифугированием при 1500 об./мин в течение 10 мин. Осадок разводили PBS и использовали для фенотипирования.

Определение иммунофенотипа DC. Определение иммунофенотипа DC проводили методом многоцветного анализа с помощью прямой реакции иммунофлуоресценции. В работе использовали панель моноклональных антител: CD80 FITC, CD86 (B7–2) PE, HLA-DR PC7 (Beckman Coulter, США), CD14 PerCP-Cy5.5, CD83APC, CD40PE-Cy7 (Becton Dickinson, США) с соответствующими изотипическими контролями. Фенотипирование проводили на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (Becton Dickinson, США). Настройка параметров измерения была выполнена однократно и стандартизируется при помощи частиц для проверки и настройки прибора BD™CS&T Beads (BD Cytometer Setup and Tracking Beads). Окрашенные клетки инкубировали 30 мин и отмывали для дальнейшего определения иммунофенотипа. Результаты выражали в процентном содержании клеток.

Микроскопия культуры. Визуальные характеристики дендритных клеток при культивировании в динамике определяли с помощью ин-

вертированного микроскопа Zeiss OBSERVER. Z1 и программы визуализации изображений AxioVision Rel.4.8, используя световую и фазово-контрастную микроскопию.

Статистика. Для статистической обработки результатов использовали пакет программ STATISTICA 6.0. Результаты исследования обработаны методами непараметрической статистики с применением критерия парных сравнений Вилкоксона и критерия Колмогорова–Смирнова. Различия считали статистически значимыми при вероятности ошибки $p < 0,05$.

Результаты

Микроскопию культуры DC проводили в процессе роста культуры. Незрелые дендритные клетки при наблюдении фиксировались как достаточно крупные клетки округлой или овальной формы, практически без отростков, единичные или образующие малочисленные колонии, адгезированные к поверхности пластика (рис. 1А, Б, III обложка).

Через двое суток после активации DC становятся более крупными с выраженными отростками, начинают открепляться от пластика и формируют многочисленные колонии (рис. 2А, Б, III обложка).

Указанные изменения после активации происходят аналогично и на DC пациентов, и на DC условно здоровых доноров, то есть и у пациентов и условно здоровых DC при созревании увеличиваются в размерах и приобретают отростчатую форму.

Характеристика иммунофенотипа DC. Незрелые DC здоровых добровольцев характеризуются сниженной экспрессией ассоциированных с созреванием молекул CD83, CD80, CD86. После стимуляции у клеток здоровых доноров статистически достоверно возрастает процент клеток, несущих CD83, маркер терминальной дифференцировки, и костимулирующих молекул CD86 и CD80 (табл. 1).

При исследовании фенотипа незрелых DC пациентов с остеомиелитом отмечается практически полное отсутствие клеток, экспрессирующих CD80, и снижение доли CD83-положительных клеток. У большинства обследованных процент клеток, несущих костимулирующие молекулы CD86 и CD40, также снижен (табл. 2).

Сравнение фенотипа незрелых DC с использованием лазерной проточной цитофлуориметрии показало, что экспрессия CD86, CD83, CD80, CD40 у пациентов с хроническим остеомиелитом была ниже, чем экспрессия соответствующих маркеров у условно здоровых доноров.

После стимуляции DC пациентов с остеомиелитом закономерно увеличивается про-

Таблица 1. Экспрессия специфических маркеров на дендритных клетках условно здоровых доноров, % (M±m)

Table 1. Expression of surface markers on volunteer-derived dendritic cells, % (M±m)

Группы n = 6 Groups n = 6	CD14	CD86*	CD83*	HLA-DR	CD80*	CD40
Незрелые DC Immature DCs	22,87±6,38	80,62±2,59	23,22±6,59	95,82±3,06	13,53±4,81	79,48±9,92
Зрелые DC Mature DCs	19,33±8,79	92,02±1,57	75,33±9,93	95,46±1,89	73,93±10,94	94,92±1,48
p-value	0,463072	0,046400	0,027709	0,685831	0,027709	0,115853

Примечание. *p < 0,05 критерий Вилкоксона.

Note. *p < 0.05, according to the Wilcoxon test.

цент клеток CD83⁺, а именно: у большинства обследованных их количество превышает 80%, а у отдельных пациентов достигает 90–95%. Одновременно фиксируется статистически значимое увеличение доли клеток, несущих CD86, CD80, CD40. По мере созревания дендритных клеток различия, выявленные на незрелых клетках у здоровых добровольцев и у пациентов с остеомиелитом, исчезают. На 10 сутки уровень экспрессии ключевых маркеров и у здоровых доноров, и у пациентов гнойного отделения оказывается на близких по значениям уровнях.

Процесс созревания DC из моноцитов крови человека сопровождается изменением экспрессии поверхностных антигенов — CD14 (маркер моноцитов/макрофагов) и CD83 (маркер терминальной дифференцировки). В популяции незрелых DC доля CD14-позитивных клеток выше, чем CD83⁺, а при созревании соотношение меняется на противоположное. Поскольку дифференцировка моноцитов в DC связана с потерей моноцитами CD14 молекул, а созревание незрелых DC в зрелые — с приобретением маркера терминальной дифференцировки CD83, уменьшение доли CD14⁺ клеток и увеличение CD83⁺ клеток является признаком дифференцировки и созревания DC [3]. Среди костимулирующих молекул, которые необходимы для представления антигена на зрелых DC экспрессируются CD40, CD80, CD86. Уровни экспрессии костимулирующих молекул изменяют-

ся по мере созревания DC. CD86 синтезируется на ранних стадиях созревания DC, тогда как CD80 появляется лишь у зрелых DC. Указанная тенденция наблюдалась при созревании DC как у пациентов с хроническим остеомиелитом, так и у здоровых доноров (рис. 3, 4).

Следует отметить, что в процессе созревания *in vitro* экспрессия CD83 у пациентов с остеомиелитом увеличивается в среднем в 4,8 раз против 3,2 — у здоровых доноров, а CD80 в 29 раз, против 5,5 соответственно.

Обсуждение

Известно, что остеомиелит развивается в результате попадания бактерий в костную ткань, надкостницу или костный мозг. Несмотря на то, что все виды бактерий могут вызывать остеомиелит, основным патогенном при хроническом остеомиелите остается стафилококк, преимущественно *Staphylococcus aureus* и, в меньшей степени, *Staphylococcus epidermidis* [29]. Патологическое действие микроорганизмов связано как с их присутствием и жизнедеятельностью в остеомиелитическом очаге, так и с выбросом во внутреннюю среду эндотоксинов. Для обнаружения признаков инфекции DC снабжены рецепторами к молекулярным паттернам патогенов (МПП). Поглощение микроорганизмов и сопутствующее этому распознавание МПП ведут к созреванию DC.

Таблица 2. Экспрессия специфических маркеров на дендритных клетках пациентов с хроническим гнойным остеомиелитом, % (M±m)

Table 2. Expression of surface markers on dendritic cells derived from patients with chronic purulent osteomyelitis, % (M±m)

Группы (n = 6) Groups (n = 6)	CD14*	CD86*	CD83*	HLA-DR	CD80*	CD40*
Незрелые DC Immature DCs	32,50±7,22	57,48±9,68	17,23±7,35	90,10±4,39	2,65±0,91	66,78±13,87
Зрелые DC Mature DCs	10,58±4,99	93,38±2,00	82,45±6,43	97,72±0,52	76,75±10,14	90,12±4,20
p-value	0,027709	0,027709	0,027709	0,074736	0,027709	0,046400

Примечание. *p < 0,05 критерий Вилкоксона.

Note. *p < 0.05, according to the Wilcoxon test.

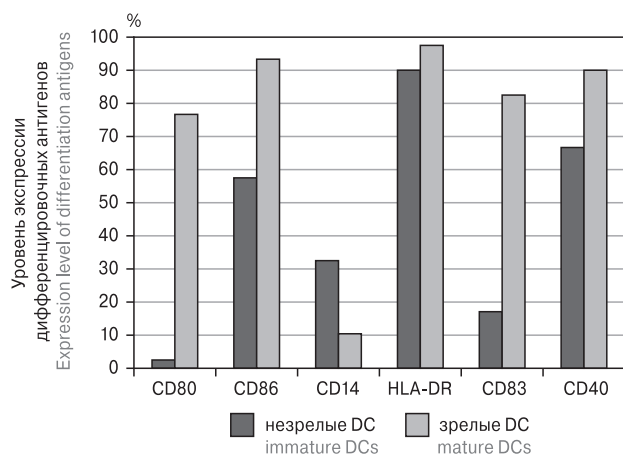


Рисунок 3. Фенотип дендритных клеток пациента с хроническим остеомиелитом

Figure 3. Phenotype of dendritic cells derived from an individual patient with chronic osteomyelitis

Суммируя данные о взаимодействии стафилококка и DC, Ву с соавт. (2014) отмечают, что DC играют сложную роль в инфекционных заболеваниях, вызванных золотистым стафилококком [33]. Авторы считают, что различные субпопуляции DC могут осуществлять различные иммунные реакции против инфекций, вызванных *S. aureus*, что может объяснять различные исходы заболеваний у пациентов, инфицированных *S. aureus*. В экспериментальных исследованиях показано, что истощение пула DC у CD11c-DTR-трансгенных мышей приводит к увеличению бактериальной нагрузки *S. aureus* в почках и легких, более высокому уровню смертности, более тяжелым воспалительным травмам и блокаде продукции IL-12. В то же время искусственное введение или незрелых, или LPS-созревших DC костномозгового происхождения в нормальных BALB/c мышей улучшило способность этих животных элиминировать бактерии *S. aureus* в легких [26].

В свою очередь *S. aureus* влияет на функции DC и может непосредственно убивать их, чтобы избежать иммунного клиренса. Dumont A.L. с соавт. показали, что стафилококковый цитотоксин — лейкоцидин A/B (LukAB) ответствен за цитотоксичность по отношению к DC моноцитарного происхождения. Хотя LukA и LukB по отдельности мало влияют на клеточную жизнеспособность, сочетание очищенного рекомбинантного LukA и LukB эффективно убивает DC [14]. Продемонстрировано, что тейхоевая кислота — гликополимер клеточной стенки грамположительных бактерий, важнейший компонент клеточной стенки *S. aureus*, имеет серьезное значение для индукции и созревания DC [17]. Факторы вирулентности

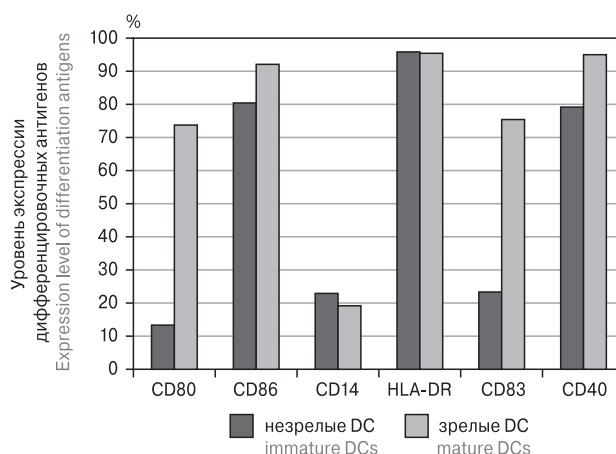


Рисунок 4. Фенотип дендритных клеток условно здорового донора

Figure 4. Phenotype of dendritic cells of a conditionally healthy donor

S. aureus активно модулируют производство цитокинов и процесс апоптоза, что, в свою очередь, указывает на возможную роль этих белков в модуляции DC опосредованного иммунитета *S. aureus* [13]. Например, у линейных мышей фенол-растворимые пептиды модулина (основного фактора метилен-резистентных штаммов *S. aureus*) непосредственно влияют на сигнальный путь p-38 CREB в DC, нарушая синтез цитокинов, и в результате повышая толерантность к патогену [9].

Таким образом, такие патогены как *S. aureus* имеют развитую тактику уклонения от иммунного клиренса, ослабляя активацию и функции DC. И хотя механизмы взаимодействия стафилококка с дендритными клетками еще окончательно не ясны, несомненно значение этой клеточной популяции для формирования иммунного ответа при стафилококковой инфекции.

В работе, проведенной нашими коллегами [6], показано, что у пациентов с остеомиелитом возрастает среднее содержание классических DC в крови с преобладанием незрелых DC, без сколь-либо значительного количества DC, созревших в очаге инфекции.

Полученные нами результаты демонстрируют способность DC, выделенных из моноцитов периферической крови пациентов с хроническим остеомиелитом, под влиянием активаторов *in vitro* дифференцироваться в зрелые DC, что выражается в статистически достоверном увеличении ассоциированных с созреванием молекул CD83, CD80, CD86 при снижении содержания CD14⁺ клеток. Аналогичные изменения отмечаются и при исследовании DC, выделенных из моноцитов периферической крови здоровых добровольцев. При этом изменение экспрессии антигена терминальной дифферен-

цировки CD83 и костимулирующей молекулы CD80 в процессе созревания у пациентов с хроническим остеомиелитом выражено значительно, чем у здоровых.

Преобладание незрелых клеток в крови пациентов с хроническим остеомиелитом, воз-

можно, играет роль в неадекватной реализации иммунного ответа при этой патологии и требует определенной коррекции, которая может быть основана на использовании созревания аутологичных ДС из мононуклеаров периферической крови пациентов *in vitro*.

Список литературы/References

1. Ключевский В.В., Сметанин С.М., Соловьев И.Н. Лечение открытых переломов бедренной кости // Гений ортопедии. 2012. № 1. С. 11–14. [Kliuchevsky V.V., Smetanin S.M., Soloviyov I.N. Treatment of open femoral fractures. *Genij Ortopedii*, 2012, no. 1, pp. 11–14. (In Russ.)]
2. Кузнецова А.В., Данилова Т.И., Гладских О.П., Иванов А.А., Пальцев М.А. Дендритные клетки и их использование в иммунотерапии // Молекулярная медицина. 2003. № 3. С. 3–17. [Kuznetsova A.V., Danilova T.I., Gladskikh O.P., Ivanov A.A., Paltsev M.A. Dendritic cells and their use in immunotherapy. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine*, 2003, no. 3, pp. 3–17. (In Russ.)]
3. Пальцев М.А. Введение в молекулярную медицину. М.: Медицина, 2004. 496 с. [Paltsev M.A. Introduction to molecular medicine. *Moscow: Meditsina*, 2004. 496 p. (In Russ.)]
4. Пашенков М.В., Пинегин Б.В. Основные свойства дендритных клеток // Иммунология. 2001. № 4. С. 7–16. [Paschenkov M.V., Pinegin B.V. Basic properties of dendritic cells. *Immunologiya = Immunology*, 2001, no. 4, pp. 7–16. (In Russ.)]
5. Столяров Е.А., Батаков Е.А., Алексеев Д.Г., Батаков В.Е. Замещение остаточных костных полостей после некр-секвестрэктомии при хроническом остеомиелите // Гений ортопедии. 2009. № 4. С. 11–16. [Stoliarov E.A., Batakov E.A., Alekseyev D.G., Batakov V.E. Filling residual bone cavities after necrosectomy for chronic osteomyelitis. *Genij Ortopedii*, 2009, no. 4, pp. 11–16. (In Russ.)]
6. Талаев В.Ю., Талаева М.В., Лебедев М.Ю., Воронина Е.В., Живцов О.П., Заиченко И.Е., Бабайкина О.Н. Фенотипическая характеристика классических дендритных клеток крови и их субпопуляций в норме и при остеомиелите // Иммунология. 2017. Т. 38, № 4. С. 229–234. [Talayev V.Yu., Talaeva M.V., Lebedev M.Yu., Voronina E.V., Zhivtsov O.P., Zaichenko I.Ye., Babaykina O.N. Phenotypic characteristics of bloodborne classical dendritic cells and their subpopulations in norm and in osteomyelitis. *Immunologiya = Immunology*, 2017, vol. 38, no. 4, pp. 229–234. (In Russ.)]
7. Тевс Д.С., Калущкий П.В., Лазаренко В.А. Нарушения иммунного и цитокинового статуса у больных хроническим остеомиелитом костей стопы // Казанский медицинский журнал. 2013. Т. 94, № 4. С. 460–463. [Tevs D.S., Kalutsky P.V., Lazarenko V.A. Immune and cytokine disorders in patients with chronic foot osteomyelitis. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*, 2013, vol. 94, no. 4, pp. 460–463. (In Russ.)]
8. Чепелева М.В., Ключин Н.М. Иммунологические особенности хронического посттравматического остеомиелита // Травматология и ортопедия России. 2012. № 2. С. 67–70. [Chepeleva M.V., Klyushin N.M. Peculiar immunological properties of chronic posttraumatic osteomyelitis. *Travmatologiya i ortopediya Rossii = Traumatology and Orthopedics of Russia*, 2012, no. 2, pp. 67–70. doi: 10.21823/2311-2905-2012-2-67-70 (In Russ.)]
9. Armbruster N.S., Richardson J.R., Schreiner J., Klenk J., Günter M., Kretschmer D., Pöschel S., Schenke-Layland K., Kalbacher H., Clark K., Autenrieth S.E. PSM Peptides of *Staphylococcus aureus* activate the p38-CREB pathway in dendritic cells, thereby modulating cytokine production and T cell priming. *J. Immunol.*, 2016, vol. 196, pp. 1284–1292. doi: 10.4049/jimmunol.1502232
10. Bhattacharya R., Kundu B., Nandi S.K., Basu D. Systematic approach to treat chronic osteomyelitis through localized drug delivery system: bench to bed side. *Mater. Sci. Eng. C*, 2013, vol. 33, no. 7, pp. 3986–3993. doi: 10.1016/j.msec.2013.05.036
11. Bowen T.R., Widmaier J.C. Host classification predicts infection after open fracture. *Clin. Orthopaed. Rel. Res.*, 2005, vol. 433, pp. 205–211. doi: 10.1097/01.blo.0000150345.51508.74
12. Byun E.H., Kim W.S., Shin A.R., Kim J.S., Whang J., Won C.J., Choi Y., Kim S.Y., Koh W.J., Kim H.J., Shin S.J. Rv0315, a novel immunostimulatory antigen of *Mycobacterium tuberculosis*, activates dendritic cells and drives Th1 immune responses. *Mol. Med.*, 2012, vol. 90, pp. 285–298. doi: 10.1007/s00109-011-0819-2
13. Cruciani M., Etna M.P., Camilli R., Giacomini E., Percario Z.A., Severa M., Sandini S., Rizzo F., Brandi V., Balsamo G., Polticelli F., Affabris E., Pantosti A., Bagnoli F., Coccia E.M. *Staphylococcus aureus* Exs Factors Control Human Dendritic Cell Functions Conditioning Th1/Th17 Response. *Cell Infect. Microbiol.* 2017, vol. 21, no. 7, p. 330. doi: 10.3389/jcimb.2017.00330
14. Dumont A.L., Nygaard T.K., Watkins R.L., Smith A., Kozhaya L., Kreiswirth B.N., Shopsis B., Unutmaz D., Voyich J.M., Torres V.J. Characterization of a new cytotoxin that contributes to *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Mol. Microbiol.*, 2011, vol. 79, no. 3, pp. 814–825.
15. Etna M.P., Giacomini E., Severa M., Pardini M., Aguiló N., Martín C., Coccia E.M. A human dendritic cell-based *in vitro* model to assess *Mycobacterium tuberculosis* SO2 vaccine immunogenicity. *Altex*, 2014, vol. 31, no. 4, pp. 397–406. doi: 10.14573/altex.1311041
16. Filley A.C., Dey M. Neurooncol. Dendritic cell based vaccination strategy: an evolving paradigm. *J. Neuro-Oncol.*, 2017, vol. 133, no. 2, pp. 223–235. doi: 10.1007/s11060-017-2446-4
17. Hong S.J., Kim S.K., Ko E.B., Yun C.H., Han S.H. Wall teichoic acid is an essential component of *Staphylococcus aureus* for the induction of human dendritic cell maturation. *Mol. Immunol.*, 2017, vol. 81, pp. 135–142. doi: 10.1016/j.molimm.2016.12.008
18. Kinik H., Karaduman M. Cierny-Mader Type III chronic osteomyelitis: the results of patients treated with debridement, irrigation, vancomycin beads and systemic antibiotics. *Int. Orthop.*, 2008, vol. 32, no. 4, pp. 551–558. doi: 10.1007/s00264-007-0342-9

19. Kumar G., Roger P.M., Ticchioni M., Trojani C., Bernard de Dompsur R., Bronsard N., Carles M., Bernard E. T cells from chronic bone infection show reduced proliferation and a high proportion of CD28⁻ CD4⁺ T cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 2014, vol. 176, no. 1, pp. 49–57. doi: 10.1111/cei.12245
20. Lin Y., Okada H. Cellular immunotherapy for malignant gliomas. *Expert. Opin. Biol. Ther.*, 2016, vol. 16, no. 10, pp. 1265–1275. doi: 10.1080/14712598.2016.1214266
21. McCormick S., Shaler C.R., Xing Z. Pulmonary mucosal dendritic cells in T-cell activation: implications for TB therapy. *Expert Rev. Respir. Med.*, 2011, vol. 5, no. 1, pp. 75–85. doi: 10.1586/ers.10.81
22. Naique S.B., Pearse M., Nanchahal J. Management of severe open tibial fractures. *J. Bone Joint Surg.*, 2006, vol. 88, pp. 351–357. doi: 10.1302/0301-620X.88B3.17120
23. Palucka K., Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat. Rev. Cancer*, 2012, vol. 12, no. 4, pp. 265–277. doi: 10.1038/nrc3258
24. Romano E., Rossi M., Ratzinger G., de Cos M.-A., Chung D.J., Panageas K.S. Peptide-loaded Langerhans cells, despite increased IL15 secretion and T-cell activation in vitro, elicit antitumor T-cell responses comparable to peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells in vivo. *Clin. Cancer Res.*, 2011, vol. 17, pp. 1984–1997. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-3421
25. Saliba H., Heurtault B., Bouharoun-Tayoun H., Flacher V., Frisch B., Fournel S., Chamat S. Enhancing tumor specific immune responses by transcutaneous vaccination. *Expert Rev. Vaccines*, 2017, vol. 16, no. 11, pp. 1079–1094. doi: 10.1080/14760584.2017.1382357
26. Schindler D., Gutierrez M.G., Beineke A., Rauter Y., Rohde M., Foster S., Goldmann O., Medina E. Dendritic cells are central coordinators of the host immune response to Staphylococcus aureus bloodstream infection. *Am. J. Pathol.*, 2012, vol. 181, no. 4, pp. 1327–1337. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.06.039
27. Segura E. Review of mouse and human dendritic cell subsets. *Meth. Mol. Biol.*, 2016, vol. 1423, pp. 3–15. doi: 10.1007/978-1-4939-3606-9_1
28. Timmerman J.M., Czerwinski D.K., Davis T.A., Hsu F.J., Benike C., Hao Z.M., Taidi B., Rajapaksa R., Caspar C.B., Okada C.Y., van Beckhoven A., Liles T.M., Engleman E.G., Levy R. Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood*, 2002, vol. 99, no. 5, pp. 1517–1526. doi: 10.1182/blood.V99.5.1517
29. Tong S.Y., Davis J.S., Eichenberger E., Holland T.L., Fowler V.G. Jr. Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2015, vol. 28, no. 3, pp. 603–661. doi: 10.1128/CMR.00134-14
30. Wagner C., Heck D., Lautenschläger K., Iking-Konert C., Heppert V., Wentzensen A., Hänsch G.M. T lymphocytes in implant-associated posttraumatic osteomyelitis: identification of cytotoxic T effector cells at the site of infection. *Shock*, 2006, vol. 25, no. 3, pp. 241–246. doi: 10.4061/2010/526740
31. Wagner J.M., Jaurich H., Wallner C., Abraham S., Becerikli M., Dadras M., Harati K., Duhan V., Khairnar V., Lehnhardt M., Behr B. Diminished bone regeneration after debridement of posttraumatic osteomyelitis is accompanied by altered cytokine levels, elevated B cell activity, and increased osteoclast activity. *J. Orthop. Res.*, 2017, vol. 35, no. 11, pp. 2425–2434. doi: 10.1002/jor.23555
32. Wang Y., Wang J., Meng J., Jiang H., Zhao J., Qian H., Chen T. Epigenetic modification mediates the increase of LAG-3⁺ T cells in chronic osteomyelitis. *Inflammation*, 2017, vol. 40, no. 2, pp. 414–421. doi: 10.1007/s10753-016-0486-0
33. Wu X., Xu F. Dendritic cells during Staphylococcus aureus infection: subsets and roles. *J. Transl. Med.*, 2014, vol. 12, pp. 358. doi: 10.1186/s12967-014-0358-z
34. Yu J.S., Liu G., Ying H., Yong W.H., Black K.L., Wheeler C.J. Vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells elicits antigen-specific, cytotoxic T-cells in patients with malignant glioma. *Cancer Res.*, 2004, vol. 64, pp. 4973–4979. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3505
35. Yu J.S., Wheeler C.J., Zeltzer P.M., Ying H., Finger D.N., Lee P.K., Yong W.H., Incardona F., Thompson R.C., Riedinger M.S., Zhang W., Prins R.M., Black K.L. Vaccination of malignant glioma patients with peptide-pulsed dendritic cells elicits systemic cytotoxicity and intracranial T-cell infiltration. *Cancer Res.*, 2001, vol. 61, no. 3, pp. 842–847. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3505

Авторы:

Рубцова Ю.П., к.б.н., научный сотрудник группы биотехнологий ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет МЗ РФ, Нижний Новгород, Россия;

Алейник Д.Я., к.м.н., старший научный сотрудник группы биотехнологий ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет МЗ РФ, Нижний Новгород, Россия;

Живцов О.П., к.м.н., научный сотрудник отдела гнойной остеологии ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет МЗ РФ, Нижний Новгород, Россия;

Митрофанов В.Н., к.м.н., старший научный сотрудник отдела гнойной остеологии ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет МЗ РФ, Нижний Новгород, Россия.

Authors:

Rubtsova J.P., PhD (Biology), Researcher, Biotechnology Department, Privolzhsky Research Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Aleynik D.Y., PhD (Medicine), Senior Researcher, Biotechnology Department, Privolzhsky Research Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Zhivtsov O.P., PhD (Medicine), Researcher, Purulent Traumatology Department, Privolzhsky Research Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Mitrofanov V.N., PhD (Medicine), Senior Researcher, Purulent Traumatology Department, Privolzhsky Research Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation.

Поступила в редакцию 04.04.2018
Отправлена на доработку 11.03.2019
Принята к печати 14.03.2019

Received 04.04.2018
Revision received 11.03.2019
Accepted 14.03.2019

ВЫЯВЛЕНИЕ РОЛИ МЕТИЦИЛЛИНРЕЗИСТЕНТНЫХ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* И ИХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ В РАЗВИТИИ ГНОЙНО- НЕКРОТИЧЕСКИХ ФОРМ СИНДРОМА ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ

О.Е. Хохлова¹, Я. Ивао⁵, В.В. Камшилова³, О.В. Теплякова^{1,4}, А.И. Мотова³,
А.И. Дробушевская⁴, О.В. Перьянова^{1,2}, Ю.С. Винник¹, Н.К. Поткина^{1,2},
Д.Э. Здзитовецкий^{1,4}, Т. Ямамото^{2,5}

¹ ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия

² Российско-Японский центр микробиологии, метагеномики и инфекционных заболеваний, г. Красноярск, Россия

³ КГБУЗ Красноярская межрайонная клиническая больница скорой медицинской помощи им. Н.С. Карповича, г. Красноярск, Россия

⁴ КГБУЗ Красноярская межрайонная клиническая больница № 7, г. Красноярск, Россия

⁵ Международный медицинский образовательно-исследовательский центр (IMERC), Ниигата, Япония

Резюме. Гнойно-некротические осложнения у больных с синдромом диабетической стопы являются одной из главных причин ампутаций и инвалидизации и даже гибели пациентов. Целью данной работы явилось изучение роли MRSA и их молекулярно-генетических особенностей, а также антибиотикорезистентности в развитии гнойно-некротических форм синдрома диабетической стопы пациентов г. Красноярск за период 2010–2016 гг. Исследована в динамике микрофлора гнойно-некротических осложнений у 240 пациентов с синдромом диабетической стопы, ее антибиотикочувствительность, а также молекулярно-генетические особенности метициллинрезистентных *Staphylococcus aureus*. Для изучения микрофлоры гнойных осложнений использован бактериологический метод. Антибиотикочувствительность определяли диско-диффузионным методом; чувствительность стафилококков к антибиотикам проводили методом скрининга, ПЦР, методом серийных разведений в плотной среде в соответствии с международными рекомендациями CLSI, EUCAST. Для генотипирования и определения молекулярно-генетических особенностей — ПЦР, М-ПЦР, секвенирование. Обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы WHONET (ВОЗ). Уровень значимости $p < 0,05$. Микрофлора гнойно-некротических форм синдрома диабетической стопы представлена грамотрицательными микроорганизмами — на долю представителей семейства *Enterobacteriaceae* приходилось 34,4%, неферментирующих грамотрицательных бактерий — 19,1%; грамположительными

Адрес для переписки:

Хохлова Ольга Евгеньевна
660022, Россия, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1,
Красноярский государственный медицинский университет
имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого.
Тел.: 8 (391) 220-13-61; 8 (908) 018-99-84 (моб.).
E-mail: khokhlovaol@mail.ru

Contacts:

Olga E. Khokhlova
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk, Partizan Zheleznyak str., 1,
Krasnoyarsk State Medical University named after professor
V.F. Voyno-Yasenetsky.
Phone: +7 (391) 220-13-61; +7 (908) 018-99-84 (mob.).
E-mail: khokhlovaol@mail.ru

Библиографическое описание:

Хохлова О.Е., Ивао Я., Камшилова В.В., Теплякова О.В.,
Мотова А.И., Дробушевская А.И., Перьянова О.В., Винник Ю.С.,
Поткина Н.К., Здзитовецкий Д.Э., Ямамото Т. Выявление роли
метициллинрезистентных *Staphylococcus aureus* и их молекулярно-
генетических особенностей в развитии гнойно-некротических форм
синдрома диабетической стопы // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9,
№ 1. С. 95–106. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-95-106

© Хохлова О.Е. и соавт., 2019

Citation:

Khokhlova O.E., Iwao Y., Kamshilova V.V., Teplyakova O.V., Motova A.I.,
Drobusheskaya A.I., Peryanova O.V., Vinnik Yu.S., Potkina N.K.,
Zdzitowiecki D.E., Yamamoto T. A role of methicillinresistant *Staphylococcus*
aureus strains and related molecular genetic features in developing purulent-
necrotic forms of the diabetic foot syndrome // Russian Journal of Infection
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 95–106.
doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-95-106

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2019-1-95-106>

микроорганизмами — в 46,5% случаев, доля *S. aureus* — 18,4%. Микроорганизмы характеризовались полирезистентностью к антимикробным препаратам: доля БЛРС-продуцентов — 36,4%; доля МБЛ-продуцентов — 30,3%; доля MRSA — 36,4%. Доминирующим клоном MRSA среди пациентов с гнойно-некротическими формами синдрома диабетической стопы, госпитализированных в правобережный и левобережный стационары г. Красноярск являлся ST239/spa3(t037)/agr1/SCCmecIII.1.1.2(IIIA)/coaIV/tst+, характеризующийся высоким уровнем вирулентности и мультирезистентностью. Вторыми по значимости генетическими вариантами MRSA являлись ST8/spa1(t008)/agr1/SCCmecIV.3.1.1/CoaIII и ST12/spanew(t156)/agr1/SCCmecUT/coaIorVII, которые характеризовались устойчивостью к 1–2 группам антимикробных препаратов, помимо β-лактамов. Среди пациентов с гнойно-некротическими формами синдрома диабетической стопы, госпитализированных в стационары г. Красноярск распространены в основном генетические варианты MRSA, соответствующие клонам, выявленным ранее от пациентов с другими нозологиями на данной территории. Установлено, что среди от пациентов с гнойно-некротическими формами синдрома диабетической стопы, госпитализированных как в правобережный, так и левобережный стационары г. Красноярск, выделяются изоляты MRSA, преимущественно относящиеся к одним и тем же генетическим вариантам. Длительная госпитализация пациентов с данной патологией, а также их последующая неоднократная госпитализация в другие стационары г. Красноярск, способствует переносу госпитальных штаммов из одного стационара в другой.

Ключевые слова: микрофлора, антибиотикорезистентность, метициллинрезистентные *S. aureus*, молекулярно-генетические особенности, синдром диабетической стопы, гнойно-некротические осложнения.

A ROLE OF METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* STRAINS AND RELATED MOLECULAR GENETIC FEATURES IN DEVELOPING PURULENT-NECROTIC FORMS OF THE DIABETIC FOOT SYNDROME

Khokhlova O.E.^a, Iwao Y.^c, Kamshilova V.V.^c, Teplyakova O.V.^{a,d}, Motova A.I.^c, Drobusheskaya A.I.^d, Peryanova O.V.^{a,d}, Vinnik Yu.S.^a, Potkina N.K.^{a,b}, Zdzitowiecki D.E.^{a,c}, Yamamoto T.^{b,e}

^a Krasnoyarsk State Medical University named after professor V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation

^b Russia-Japan Center of Microbiology, Metagenomics and Infectious Diseases, Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

^c Krasnoyarsk State Emergency Hospital named after N.S. Karpovich, Krasnoyarsk, Russian Federation

^d Krasnoyarsk State Municipal Clinical Hospital No. 7, Krasnoyarsk, Russian Federation

^e International Medical Education and Research Center, Niigata, Japan

Abstract. Purulent-necrotic complications in patients with diabetic foot syndrome is one of the main causes resulting in amputation and disability, or even lethal outcome. Our study was aimed at investigating a role played by MRSA and related molecular genetic features, as well as antibiotic resistance in developing purulent-necrotic forms of the diabetic foot syndrome in Krasnoyarsk, in the 2010–2016 period. A microbiota profile related to purulent-necrotic complications, antibiotic susceptibility, as well as the molecular genetic features of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* were examined in 240 patients with diabetic foot syndrome. A bacteriological method was used to investigate microbiota profile related to purulent complications. Antibiotic sensitivity was analyzed by disc-diffusion method; staphylococcal antibiotic sensitivity was evaluated by screening, PCR, solid medium serial dilution, in accordance with the CLSI and EUCAST international recommendations. Genotyping and examining molecular genetic features were performed by using PCR, M-PCR, and sequencing. The data were analyzed by using WHONET (WHO) software. Significance level was set at $p < 0.05$. It was found that microbiota profile linked to purulent-necrotic forms of the diabetic foot syndrome was presented by various Gram-negative microorganisms including Enterobacteriaceae spp. and non-fermenting bacteria accounting for 34.4% and 19.1%, respectively, as well as Gram-positive microorganisms found in 46.5% cases, including *S. aureus* (18.4% cases). Moreover, microorganisms were characterized by multiresistance to diverse antimicrobial drugs: percentage of BLDS- and MBL-producers as well as MRSA comprised 36.4%, 30.3%, and 36.4%, respectively. Further, MRSA ST239/spa3(t037)/agr1/SCCmecIII.1.1.2(IIIA)/coaIV/tst+ clone dominated in patients with purulent-necrotic forms of diabetic foot syndrome admitted to the right-bank and left-bank hospitals in the city of Krasnoyarsk that was characterized by a high virulence level and multidrug resistance. Next, subdominant MRSA genetic variants were presented by ST8/spa1(t008)/agr1/SCCmecIV.3.1.1/CoaIII and ST12/spanew(t156)/agr1/SCCmecUT/coaIorVII characterized by resistance to 1–2 groups of antimicrobials apart from β-lactams. Importantly, similar MRSA genetic variants earlier isolated in patients with other nosological entities common in this geographic region were also mainly verified in patients with purulent-necrotic forms of diabetic foot syndrome admitted to Krasnoyarsk hospitals. In particular, it was demonstrated that MRSA isolates predominantly belonging to the same genetic variants were detected in patients with purulent-necrotic forms of diabetic foot syndrome hospitalized both at the right-bank and left-bank hospitals of the city of Krasnoyarsk. Thus, long-term hospitalization of patients with purulent-necrotic forms of diabetic foot syndrome as well as subsequent repeated admittance to other hospitals in the city of Krasnoyarsk facilitates inter-hospital bacterial strain transmission.

Key words: microflora, antibiotic resistance, methicillin-resistant *S. aureus*, molecular genetic features, diabetic foot syndrome, purulent-necrotic complications.

Введение

Синдром диабетической стопы — самое частое осложнение сахарного диабета. С ним связана примерно треть госпитализаций этих больных. Синдром возникает у 80% больных сахарным диабетом и при наличии критической ишемии нижних конечностей без коррекции артериального кровотока частота больших ампутаций составляет 70–90%, летальность после которых достигает 60–70% [4]. Две трети пациентов умирают от гнойно-некротических поражений нижних конечностей, причем их развитие у больных сахарным диабетом наблюдается в 40 раз чаще, чем в общей популяции [7, 17, 22]. В США частота ампутаций, связанных с диабетом, составляет 66 тыс. случаев в год; в 50–70% случаев причиной ампутации стопы является гангрена [26]. Пребывание пациентов с сахарным диабетом и с гнойно-некротическими поражениями в стационаре на 50% дольше [8]. Гнойно-некротические процессы на фоне сахарного диабета возникают в результате ишемии тканей дистальных отделов конечности, нейроэндокринных отклонений, нарушения иммунного статуса, изменений в системе гемостаза, а также воздействия патогенных микроорганизмов [1, 7].

При микробиологическом исследовании поражений нижних конечностей при синдроме диабетической стопы без риска ампутации наиболее часто выделяют *S. aureus* и β -гемолитические стрептококки (групп А, В, С, G) [6, 11]. Диабетическое поражение нижних конечностей имеет хроническое течение и, как правило, приводит к необратимым последствиям. От пациентов, длительно болеющих и имеющих хронические инфицированные язвы стоп с высокой вероятностью необходимости ампутации, относительно часто выделяются энтерококки, энтеробактерии, анаэробы, неферментирующие грамотрицательные бактерии. Предшествующая госпитализация, длительная антибиотикотерапия препаратами широкого спектра действия и хирургическое лечение являются предрасполагающими факторами к инфицированию язв полирезистентными микроорганизмами, например метициллинрезистентными *S. aureus* (MRSA) и полирезистентными энтерококками, что значительно ухудшает прогноз у пациентов с диабетической стопой [8, 23]. Таким образом, одним из ведущих возбудителей гнойных осложнений у пациентов с синдромом диабетической стопы является MRSA, доля которых среди *S. aureus* у данных пациентов в США составляет 40–50% [26].

Сложность терапии инфекций, вызванных MRSA, обусловлена их устойчивостью не только к бета-лактамам антибиотикам, но и к широкому кругу препаратов других классов [2]. Традиционно MRSA классифицируют как ассо-

циированные с врачебной деятельностью штаммы (HA-MRSA), внебольничные штаммы (CA-MRSA), ассоциированные с животноводством штаммы (LA-MRSA) [27]. В разных странах мира распространены основные генетические клоны данных линий MRSA, различающихся по степени вирулентности и уровню антибиотикорезистентности [10, 15, 21]. Так, во Франции и Швейцарии выявили распространение среди пациентов с синдромом диабетической стопы штаммов MRSA генотип ST8/spa(t008) и ST5/ST105/spa(t002), устойчивых помимо бета-лактамов антибиотиков к гентамицину [24]. В Мексике выявлено распространение клона MRSA USA300 (ST8/spa(t008)/PVL+) среди пациентов с диабетической стопой [13].

В РФ опубликована информация о распространении генетических вариантов MRSA, изолированных от госпитализированных пациентов [14, 19], но нет информации о распространении генетических вариантов MRSA среди пациентов с синдромом диабетической стопы.

Целью данной работы явилось изучение роли MRSA и их молекулярно-генетических особенностей, а также антибиотикорезистентности в развитии гнойно-некротических форм синдрома диабетической стопы пациентов г. Красноярска за период 2010–2016 гг.

Материалы и методы

За период 2010–2016 гг. в г. Красноярске проспективно обследовано 240 больных с вторичными осложненными инфекциями кожи и мягких тканей, такими как гнойно-некротические формы синдрома диабетической стопы, госпитализированных в КГБУЗ КМКБСМП им. Н.С. Карповича и КГБУЗ Красноярская межрайонная клиническая больница № 7. Обследуемые дали информированное добровольное согласие на обследование. Работу проводили в соответствии с биомедицинской этикой согласно требованиям Женевской конвенции о правах человека (1997 г.) и Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2000 г.) при одобрении локального этического комитета ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России (№ 28/2010). Возраст обследованных 32–89 лет (средний возраст 61,2±15,9). Доля мужчин составила 55,8%, доля женщин 44,2%. Критерии включения: возраст ≥ 18 лет, сахарный диабет 2-го типа, гнойно-некротические формы синдрома диабетической стопы, госпитализация в стационар. Критерии исключения: сахарный диабет 1-го типа, ВИЧ-инфекция. Материал для исследования — биоптат, гнойное отделяемое. Забор материала осуществляли в первые 48 часов госпитализации (240 образцов) и далее по мере необходимости на 5–50 сутки госпитализации (163 образцов). Посев материала осуществля-

ли на комплекс питательных сред по методу Gould — кровяной агар, желточно-солевой агар, хром-агар. У 16 обследуемых параллельно с изучением аэробной и факультативно-анаэробной микрофлорой было проведено выделение анаэробных микроорганизмов. С этой целью осуществляли забор биоптата во время операции. Посев исследуемого материала осуществляли незамедлительно на свежеприготовленную питательную среду для выделения анаэробов — агар Шадлера по методу Gould. Чашки с посевами исследуемого материала на агар Шадлера помещали в индивидуальные газогенераторные пакеты Generbag (bioMerieux, Франция) для выделения анаэробов. Посевы инкубировали в термостате при 37°C в течение 48–96 ч. Выросшие колонии отсеивали на чашки Петри с агаром Шадлера и культивировали в аэробных и анаэробных условиях. В случае если рост наблюдался только в анаэробных условиях, культура — облигатный анаэроб, если культура росла и в аэробных условиях — факультативный анаэроб. Идентификацию исследуемых культур проводили на основании морфо-тинкториальных, культуральных и биохимических свойств, используя помимо рутинных методов тест-системы Remel (США), bioMerieux (Франция) для идентификации микроорганизмов.

Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом на агаре Мюллера–Хинтон с использованием дисков ОХОИД (Великобритания); чувствительность стафилококков к оксациллину (Sigma-Aldrich, США), цефокситину (ОХОИД, Великобритания) проводили методом скрининга; чувствительность стафилококков к другим антимикробным препаратам проводили методом серийных разведений в соответствии с международными рекомендациями CLSI, EUCAST. Продукцию бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) у энтеробактерий определяли фенотипически: методом «двойных дисков», при котором продукция определяется за счет синергизма цефалоспорины (цефотаксим, цефтазидим, цефепим) с клавулановой кислотой на среде Мюллера–Хинтон с использованием дисков с антибиотиками ОХОИД (Великобритания) [9, 12]. Продукцию металло-β-лактамаз (МБЛ) проводили методом инактивации карбапенемов (СІМ) [30]. Для внутрилабораторного контроля определения антибиотикочувствительности и метициллинорезистентности использовали референс-штаммы из коллекции ATCC (*S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 и *P. aeruginosa* ATCC 27853).

Для генетических исследований MRSA микроорганизмы культивировали в бульоне LB (Difco, Detroit, MI) при температуре 37°C до фазы логарифмического роста.

Для определения принадлежности к MRSA исследовали гены *nuc* и *tecA* с помощью ПЦР.

Праймеры для выявления гена *nuc* (*nuc1*: GCG ATTGATGGTGATACGGTT и *nuc2*: AGCCAA GCCTTGACGAACATAAGC) необходимы для дифференциации MRSA и MSSA от коагулазо-негативных стафилококков. Праймеры для выявления гена *tecA* (*tecA-QF2*: GGGATCATA GCGTCATTATTCC и *tecA-QR2*: CGATGCCTA TCTCATATGC), кодирующего синтез ПСБ2а. Режим амплификации включал начальный цикл 94°C 3 мин. Следующие этапы амплификации включали денатурацию ДНК при 94°C в течение 90 с; отжиг при 55°C в течение 60 с; синтез в течение 60 с при 72°C (30 циклов) и завершающий цикл в течение 10 мин при 72°C. Детекцию продуктов амплификации ПЦР проводили с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле с использованием бромистого этидия. В качестве контроля молекулярной массы использовали 100 bp DNA ladder (Sigma-Aldrich, Япония).

С помощью ПЦР исследовали 42 гена патогенности: 2 лейкоцидина; 4 гемолизина; 19 генов стафилококковых энтеротоксинов (SE): *tst*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep*, *seq*, *seu*; 3 эксфолиатина; *set*, *edin*, *ssl*; 14 генов адгезии [28].

Молекулярное типирование штаммов MRSA проводили в соответствии с международными стандартами [28]. MLST типирование основано на изучении семи «генов домашнего хозяйства» и определения аллельного профиля (аллельный номер) с использованием вебсайта (<http://www.mlst.net>). Данные были проанализированы с помощью программного обеспечения eBURST. SCCmec типирование (I–V типы) — с применением ПЦР, М-ПЦР. Субтипирование SCCmec проводили в соответствии с рекомендациями [16, 20] (<http://www.staphylococcus.net>).

Молекулярное типирование бактериального генома путем анализа хромосомных рестрикционных фрагментов PFGE анализ проводили с использованием SmaI, электрофорез проводили в 1,2% геле с маркерной ДНК Lambda ladder (Bio-Rad Laboratories, США) [25, 29].

Плазмидный профиль изучили модифицированным вариантом метода Kado и Liu с помощью Plasmid Midi Kit (QIAGEN Sciences, Япония) [18]. Плазмидную ДНК анализировали электрофорезом в 0,6–1% геле. Гены резистентности к антимикробным препаратам определяли методом ПЦР.

Все праймеры заказывали в ЗАО «Евроген», для постановки ПЦР использовали реактивы Thermo Fisher Scientific (США).

Обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы WHONET (ВОЗ). Критерий Шапиро–Уилка использовали для проверки количественных признаков на нормальность распределения. Количественные признаки описывались в виде минимального (min), максимального (max), среднего значений (Mean), стандартного отклонения (m); качественные

признаки представлялись в виде долей (%) и абсолютных чисел. Сравнение количественных признаков проводилось с помощью критерия Манна–Уитни. В сравнительном анализе использовался двусторонний критерий Фишера. Уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты

При исследовании биоптата, гнойного отделяемого 240 больных в первые сутки поступления в стационар рост микроорганизмов в этиологически значимом количестве был получен в 85% случаев (у 204 обследованных). При этом микроорганизмы были выделены в монокультуре в 76,4% случаев, доля ассоциаций составила 23,6%, в том числе из двух микроорганизмов — 20,1%, из трех микроорганизмов — 3,5%. В составе микрофлоры гнойного отделяемого, биоптатов преобладала грамотрицательная микрофлора и выделена в 53,5% случаев; на долю представителей семейства *Enterobacteriaceae* приходилось 34,4%, в том числе выделены *E. coli* (7,6%), *Klebsiella* spp. (9,0%), *Enterobacter* spp. (3,5%), *Proteus* spp. (10,8%) и др. (*Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Providencia rettgeri* — 3,5%). На долю неферментирующих грамотрицательных бактерий приходилось 19,1% случаев, выделены *P. aeruginosa* (13,2%), *Acinetobacter* spp. (5,9%). Грамположительные микроорганизмы, выделены в 46,5% случаев (рис. 1). В 30,2% случаев были выделены стафилококки. Доля *Enterococcus* spp. составила 15,6%, при этом преобладали *Enterococcus faecalis* (11,5%).

На 5–50 сутки госпитализации обследовано 163 больных с вторичными осложненными инфекциями кожи и мягких тканей, такими как гнойно-некротические формы синдрома диабетической стопы, госпитализированных в КГБУЗ КМКБСМП им. Н.С. Карповича и КГБУЗ Красноярскую межрайонную клиническую больницу № 7. У больных с синдромом диабетической стопы при посеве биоптатов, раневого отделяемого на 5–50 сут госпитализации рост микроорганизмов был получен в 95,1% случаев в этиологически значимом количестве. Доля ассоциаций микроорганизмов в биоптате, раневом отделяемом составила 48,4%. При исследовании биоптата, раневого отделяемого у больных с синдромом диабетической стопы в составе микрофлоры преобладали грамположительные микроорганизмы, выделенные в 50% случаев и представленные преимущественно *Staphylococcus* spp. (31,3%), а также *Enterococcus* spp. (16,2%) (рис. 2). На долю грамотрицательных микроорганизмов приходилось 48%, в том числе неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОб) приходилось 15,7% случаев, при этом среди них доминировали *P. aeruginosa*. Среди представителей семейства *Enterobacteriaceae* (32,3%) доминировали *Proteus* spp. Дрожжеподобные грибы р. *Candida*

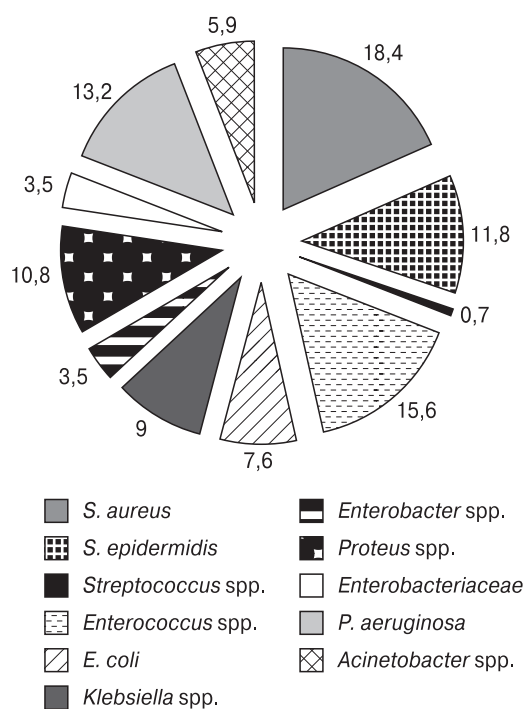


Рисунок 1. Микрофлора гнойного отделяемого, биоптата от пациентов с гнойно-некротическими формами синдрома диабетической стопы в первые сутки госпитализации (%)

Figure 1. Analyzing microflora profile in purulent discharge and biopsy samples from patients with purulent-necrotic forms of diabetic foot syndrome at day 1 during hospitalization (%)

выделены в 2% случаев. Наиболее частыми ассоциантами являлись MSSA и *P. aeruginosa*; MSSA и *A. baumannii*, *E. faecalis*; *P. aeruginosa* и *Proteus mirabilis*; *K. pneumoniae*; *E. faecalis* и *K. pneumoniae*.

При изучении антибиотикорезистентности штаммов представителей сем. *Enterobacteriaceae*, выделенных от больных с синдромом диабетической стопы в первые сутки госпитализации, резистентность их к цефтазидиму была установлена в 36,4% случаев; к цефоперазону/сульбактаму и ампициллину/сульбактаму в 3 и 11,1% случаев соответственно; к ципрофлоксацину были устойчивы 56,6% штаммов; камикацину — 24,2%; к карбапенемам — 4% (рис. 3). На 5–50 сутки госпитализации уровень резистентности штаммов представителей сем. *Enterobacteriaceae* к амикацину, цефтазидиму, цефоперазону/сульбактаму, ципрофлоксацину и карбапенемам изменился не значимо. Отмечалось увеличение резистентности к ампициллину/сульбактаму до 52,1%. Доля БЛРС-продуцентов среди энтеробактерий, выделенных в первые сутки госпитализации, составила 36,4%; на 5–50 сутки госпитализации — 35,7%.

При изучении антибиотикорезистентности неферментирующих грамотрицательных бактерий, выделенных от больных с синдромом диабетической стопы в первые сутки госпитализа-

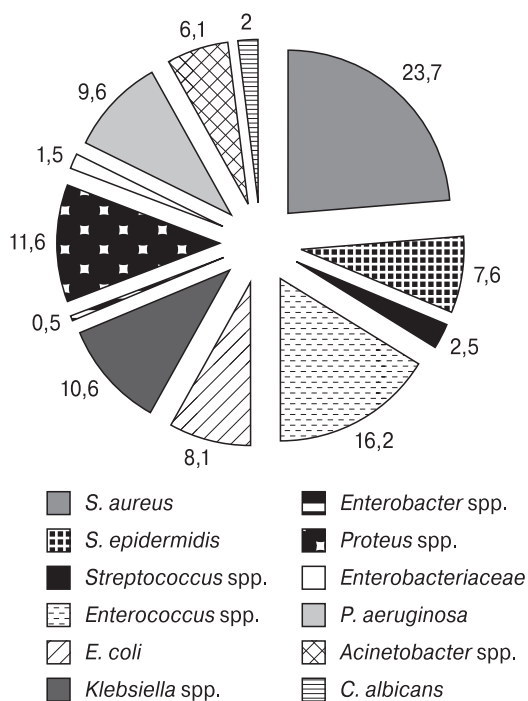


Рисунок 2. Микрофлора гнойного отделяемого, биоптата от пациентов с гнойно-некротическими формами синдрома диабетической стопы на 5–50 сутки госпитализации (%)

Figure 2. Analyzing microflora profile in purulent discharge and biopsy samples from patients with purulent-necrotic forms of diabetic foot syndrome at day 5–50 during hospitalization (%)

ции, установили их резистентность к амикацину в 49,1% случаев, к ципрофлоксацину в 47,4% случаев, к карбапенемам в 41,3% случаев. На 5–30 сутки госпитализации уровень резистентности штаммов неферментирующих грамотрицательных бактерий к карбапенемам изменился незначительно. Увеличился процент штаммов, резистентных к амикацину, до 66,7%, к ципрофлоксацину — до 70,8% (рис. 3). Доля МБЛ-продуцентов среди неферментирующих грамотрицательных бактерий, выделенных в первые сутки госпитализации, составила 30,3%; на 5–50 сутки госпитализации — 32,4%.

В первые сутки госпитализации 26,7% штаммов энтерококков были устойчивы к ампициллину. На 5–50 сутки госпитализации их доля возросла до 28,4%.

В первые сутки госпитализации доля MRSA составила 36,4%; на 5–50 сутки госпитализации — 38,8%. Среди коагулазоотрицательных стафилококков доля метициллинрезистентных штаммов составила 26,7%.

Проведено генотипирование 15 штаммов MRSA. Все выделенные штаммы MRSA были PVL-негативными, 40% изученных штаммов MRSA были отнесены к генотипу ST8/spa1(t008)/agr1/SCCmecIV.3.1.1/CoaIII, характеризовались наличием лейкоцидина lukED, гемолизина,

энтеротоксина SEA (sea), адгезинов (за исключением spa, bbp) (табл. 1). Характеризовались антибиотикорезистентностью к фторхинолонам, хлорамфениколу (гены резистентности локализованы в плазмиде 2,9 т.п.н.), в 50% случаев резистентны к аминогликозидам (гены резистентности локализованы в плазмиде 25 и 27 т.п.н.) и к макролидам (гены резистентности локализованы в плазмиде 2,4 и 2,5 т.п.н.); и чувствительностью ко всем остальным изученным препаратам. 3 штамма MRSA варианта ST8/spa1(t008)/agr1/SCCmecIV.3.1.1/CoaIII были выделены от пациентов в момент поступления в стационар и возможно относились к внебольничным, так как штаммы были выделены в срок до 48 ч госпитализации и у пациентов не было выявлено риска колонизации госпитальными штаммами. Все выделенные изоляты, относящиеся к данному генотипу были получены от пациентов, госпитализированных в разные стационары одного города.

Из выделенных штаммов MRSA 46,7% принадлежали к ST239/spa3(t037)/agr1/SCCmecIII.1.1.2 (IIIА)/coaIV, характеризовались наличием лейкоцидина lukED, гемолизина, токсина синдрома токсического шока TSST-1 (tst), энтеротоксинов SEK (sek), SEQ (seq), адгезинов (за исключением bbp). Характеризовались антибиотикорезистентностью к аминогликозидам, макролидам, линкозамидам, фторхинолонам, хлорамфениколу (гены резистентности локализованы в плазмиде 2,9 т.п.н.), рифампицину (МПК > 128 мкг/мл), сульфаметоксазол/триметоприму и чувствительностью ко всем остальным изученным препаратам. По результатам PFGE анализа данные штаммы относились к одному клону, но при этом отличались между собой на один банд, то есть не были полностью идентичными. При этом, все выделенные штаммы данного генотипа, вероятно, относились к госпитальным, так как были выделены от пациентов позднее 48 ч пребывания в стационаре (пациенты при этом находились в разных стационарах г. Красноярск).

Два выделенных штамма MRSA (13,3%) относились к ST12/spanew(t156)/agr1/SCCmecUT/coaIorVII, характеризовались наличием лейкоцидина lukED, гемолизина, энтеротоксина SEC (sec), SEP (sep), адгезинов (за исключением spa, bbp), а также чувствительностью к аминогликозидам, макролидам, тетрациклину, фторхинолонам, рифампицину, сульфаметоксазол/триметоприму, гликопептидам, оксазолидинонам, мупироцину, фосфомицину, фузидиевой кислоте; были устойчивы к хлорамфениколу, гены резистентности к которому локализовались в плазмиде (4,5 т.п.н.). Оба штамма были выделены от разных пациентов, госпитализированных в один стационар. Один из штаммов MRSA генотип ST12/spanew(t156)/agr1/SCCmecUT/coaIorVII был выделен от пациента К., мужчи-

ны 84 лет, проживавшего в г. Красноярске, 01.10.2010 г. экстренно поступившего в стационар КГБУЗ Красноярская межрайонная клиническая больница № 7 с основным диагнозом «Сахарный диабет 2 типа, стадия декомпенсации. Диабетический гломерулосклероз. Состояние после ампутации правой нижней конечности на уровне верхней трети бедра и левой нижней конечности на уровне верхней трети голени. Гнойно-некротическое воспаление культи левой голени. Сопутствующий: ИБС: дилатация полости левого желудочка сердца, мелкоочаговый кардиосклероз, стенозирующий коронаросклероз около 50%». Операции от 06.10.2010 г. и 13.10.2010 г.: вторичная хирургическая обработка раны, некрэктомия. На фоне назначенной стандартной терапии продолжалось гнойно-гранулирующее воспаление в мягких тканях культи левой голени. Начался внутриальвеолярный отек легких; образовался двусторонний гидроторакс; отмечались мелкоточечные кровоизлияния в слизистые и серозные оболочки, дистрофические изменения паренхиматозных органов. Сохраняющаяся интоксикация вследствие продолжающегося воспаления в культе усугубляла сердечную недостаточность. Развившаяся острая сердечная недостаточность привела к смерти больного 15.10.2010 г. Штамм MRSA OC50 был выделен из биоптата, забранного во время операции от 06.10.2010 г. и из аутоптата при патологоанатомическом вскрытии.

Обсуждение

Микрофлора гангренозных поражений у пациентов гнойно-некротическими формами синдрома диабетической стопы представлена как грамположительными, так и грамотрицательными микроорганизмами. При этом нами не установлено существенных различий ($p > 0,05$) в спектре микроорганизмов выделенных в первые сутки госпитализации и на 5–50 сутки. Доля *S. aureus* среди всех возбудителей гнойно-некротических осложнений синдрома диабетической стопы в первые сутки госпитализации составила 18,4%, на 5–50 сутки — 23,7%. По результатам микробиологических исследований биоптатов пациентов с синдромом диабетической стопы за рубежом доля *S. aureus* составляет 15–50% [26], таким образом, наши результаты соответствуют общемировым. В плане распространенности полирезистентных микроорганизмов среди данной категории пациентов, в частности доли MRSA, БЛРС-продуцирующих энтеробактерий, МБЛ-положительных р. *Pseudomonas*, р. *Acinetobacter*, выделенных в первые сутки госпитализации и на 5–50 сутки, также существенных различий не выявлено ($p > 0,05$). Пациенты с синдромом диабетической стопы являются особой категорией больных, поражение тканей у которых приобретает затяжной характер и требует неоднократных госпитализаций. Нарушения микроциркуляции в тяжелых случаях, таких как синдром

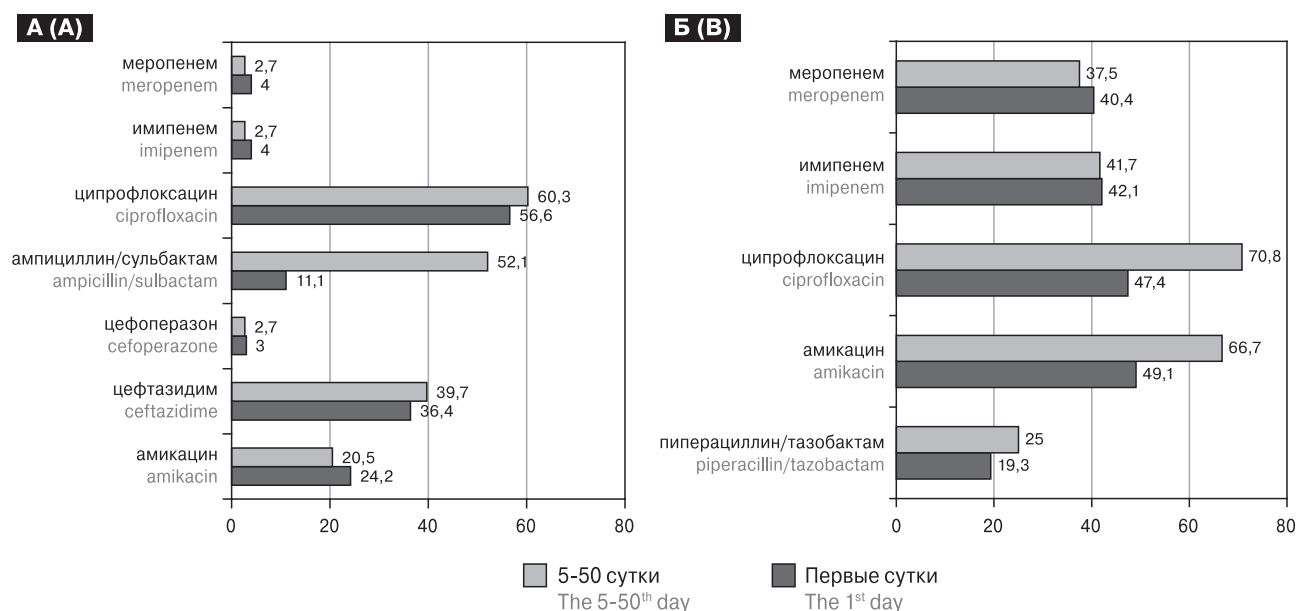


Рисунок 3. Результаты определения резистентности к антибактериальным препаратам (%)

Figure 3. Evaluation of antibacterial drug resistance (%)

Примечание. А — представителей сем. *Enterobacteriaceae*; Б — неферментирующих грамотрицательных бактерий (*Acinetobacter* spp. — изучали чувствительность к перечисленным антибиотикам, за исключением пиперациллин/тазобактама).

Note. A — *Enterobacteriaceae* spp., B — non-fermenting Gram-negative bacteria (*Acinetobacter* spp. — antibacterial drug sensitivity was examined except piperacillin/tazobactam).

Таблица 1. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов MRSA, изолированных от больных с гнойно-некротическими формами синдрома диабетической стопы

Table 1. Molecular-genetic characteristics of strains of MRSA isolated from patients with purulent-necrotic forms of the diabetic foot syndrome

Определяемые характеристики Features examined	Результаты типирования штаммов MRSA Typing of MRSA strains		
	n = 7	n = 2	n = 6
CC	8	12	8
ST	239	12	8
Spa	3 (t037)	(t156)	1 (t008)
SCCmec	III.1,1.2 (III A)	нт /ut	IV.3,1.1 (IVc)
agr	1	1	1
Coa	IV	I. VII	III
Токсины Toxins			
Лейкоцидины/Leukocidins			
<i>lukPVSF</i>	–	–	–
<i>lukE-lukD</i>	+	+	+
<i>lukM</i>	–	–	–
Гемолизины/Hemolysins			
<i>hla, hlg, hlg-v</i>	+	+	+
<i>hlb (split)</i>	(+)	(+)	(+)
Пептидные цитолизины/Peptide cytolysins			
<i>psma, hld</i>	+	+	+
Энтеротоксины/Enterotoxins			
<i>sea</i>	–	–	+
<i>tst</i>	+	–	–
<i>sec, sep, seb, sed, see, she, set, sel</i>	–	–	–
<i>SapI5 (sek, seq)</i>	+	+	–
<i>sej, seu, egc*</i>	–	–	–
Эксфолиатины/Exfoliatins			
<i>eta, etb, etd</i>	–	–	–
Адгезины Adhesins			
<i>c12ag'</i>	+	+	+
<i>cna</i>	+	+	–
<i>bbp</i>	–	–	–
Другие/Other			
<i>ACME (arcA)</i>	–	–	–
<i>ssl</i>	+	+	+
<i>edin</i>	–	–	–
Антибиотикорезистентность Antibiotic resistance			
Имипенем (МПК, мкг/мл) Imipenem (MIC, µg/ml)	32–64	0,5	0,25
Оксациллин (МПК, мкг/мл) Oxacillin (MIC, µg/ml)	> 128	64	32
Ампициллин (МПК, мкг/мл) Ampicillin (MIC, µg/ml)	32–64	8	4
Аминогликозиды Aminoglycosides	100%	0%	50%
Тетрациклины Tetracyclines	100%	0%	0%
Макролиды Macrolides	100%	0%	50%
Линкозамиды Lincosamides	100%	0%	0%
Фторхинолоны Fluoroquinolones	100%	0%	100%

Определяемые характеристики Features examined	Результаты типирования штаммов MRSA Typing of MRSA strains		
	n = 7	n = 2	n = 6
Рифампицин (МПК, мкг/мл) Rifampicin (MIC, µg/ml)	100% > 128	0% 0,008	0% 0,008
Хлорамфеникол Chloramphenicol	100%	100%	100%
Сульфаметоксазол/Триметоприм Sulfamethoxazole/Trimethoprim	100%	0%	0%
Гликопептиды Ванкомицин (МПК, мкг/мл) Glycopeptides Vancomycin (MIC, µg/ml)	0% 0,5	0% 0,5	0% 0,5
Оксазолидиноны Oxazolidinones	0%	0%	0%
Мупироцин Mupirocin	0%	0%	0%
Плазмиды (т.п.н.) Plasmids (kb)	2,9 (7/7)	4,5 (2/2)	2,9 (6/6)
	–	–	2,4 (1/6)
	–	–	2,5 (2/6)
	–	–	25 (2/6)
	–	–	27 (1/6)

Примечания. **egc* — кластер генов *seg, sei, sem, sen, seo*, кодирующих синтез энтеротоксинов. *c12ag'* — кластер генов *icaA, icaD, eno, fnbA, fnbB, ebpS, clfA, clfB, fib, sdrC, sdrD, sdrE*, кодирующих синтез адгезинов; нт — не типлируемый.

Notes. **egc* — cluster of *seg, sei, sem, sen, seo* genes encoding enterotoxin synthesis. *c12ag'* — cluster of *icaA, icaD, eno, fnbA, fnbB, ebpS, clfA, clfB, fib, sdrC, sdrD, sdrE* encoding adhesin synthesis; ut — untyped.

диабетической стопы, может сопровождаться развитием тяжелых трофических нарушений [5]. При развитии гнойного процесса, сопровождающегося некрозом тканей, помимо консервативной терапии, требуется хирургическая обработка ран, предполагающая радикальное удаление всех некротизированных тканей. Однако излишнее иссечение здоровых тканей с целью полного удаления некроза приводит к дополнительной травматизации и является причиной дальнейшего развития инфекционно-гнойного процесса, а недостаточное удаление некротических тканей и фибрина, сложности проведения некрэктомии при глубоких поражениях, а также развитие гангрены определяют необходимость ампутации конечности [3]. При этом пациентов данной категории госпитализируют в разные стационары города. Так, нами были обнаружены больные, у которых выделялись штаммы полирезистентных микроорганизмов (в частности MRSA), и которые в течение изученного периода в разные сроки находились на лечении в различных стационарах г. Красноярск.

Например, больная Л., 59 лет, пенсионерка. 11.08.2010 г. была доставлена по экстренным показаниям в стационар КГБУЗ КМКБСМП им. Н.С. Карповича с диагнозом: «Рожистое воспаление правой голени и стопы, буллезно-геморрагическая форма. Соп.: Варикозное расширение вен нижних конечностей. ПТФС. Хроническая венозная недостаточность III ст. Сахарный диабет II типа, вторичная инсулинопотребная форма, субкомпенсация». Из анамнеза: отмечала ухудшение самочувствия в те-

чении недели — температура тела поднималась до 38°C, появились локальная гиперемия кожных покровов, отек, буллы. С перечисленными жалобами была госпитализирована и получала консервативную терапию, в том числе азитромицин, положительной динамики не наблюдалось. 21.09.2010 г. из патологического материала в этиологически значимом количестве были выделены *P. aeruginosa* (резистентная к амикацину и ципрофлоксацину) и MRSA. 22.09.2010 на фоне появления участков некроза на передней поверхности правой голени была выполнена некрэктомия. После оперативного вмешательства неоднократно корректировалась антибиотикотерапия: назначался имипенем/циластатин; затем ципрофлоксацин и метронидазол; затем рифампицин и ципрофлоксацин. На фоне терапии наблюдалась положительная динамика: выраженная краевая эпителизация ран, раны очистились, отделяемое стало серозным. Пациентка была выписана 04.10.2010 (54 койко-дня).

21.10.2010 г. та же больная Л. вновь экстренно госпитализируется уже в КГБУЗ Красноярская межрайонная клиническая больница № 7 с диагнозом: «Сахарный диабет II типа тяжелое течение, стадия субкомпенсации, гнойно-некротические трофические язвы правой голени. Рожистое воспаление правой голени, буллезная форма. Варикозная болезнь вен нижних конечностей. ХВН II ст.». 21.10.2010 г. и 27.10.2010 г. проводилась хирургическая обработка ран, некрэктомия. 21.10.2010 г. при посеве биоптата из раны в этиологически значимом количестве выделены MRSA. Проведена антибиотикотера-

пия, противовоспалительная, сахароснижающая, обезболивающая терапия. На фоне лечения состояние улучшилось, язвы на голени зарубцевались, в области голеностопного сустава уменьшились в размерах, умеренно гранулировали. 11.11.2010 г. больная Л. была выписана (20 койко-дней) в удовлетворительном состоянии на амбулаторное долечивание.

Выделенные от данной пациентки штаммы MRSA OC66 и OC159 были отнесены к одному и тому же генотипу ST239/spa3(t037)/SCCmecIII.1.1.2(IIIА)/coaIV/agrI и характеризовались: наличием лейкоцидина lukED, гемолизинов, токсина синдрома токсического шока TSST-1 (tst), энтеротоксинов SEK (sek), SEQ (seq), адгезинов (за исключением bbb) (табл. 1). Штаммы были устойчивы практически ко всем группам антимикробных препаратов — беталактамам (МПК оксациллин — 128 мкг/мл, имипенем — 16 мкг/мл), аминогликозидам, макролидам, линкозамидам, фторхинолонам, рифампицину (МПК > 128 мкг/мл), хлорамфениколу, сульфаметоксазол/триметоприму, и сохраняли чувствительность к ванкомицину, линезолиду, тейкопланину, мупиноцину, фосфомицину, фузидовой кислоте. Данные PFGE показали идентичность штаммов MRSA, изолированных от одной пациентки, во время обеих госпитализаций в разных стационарах.

Таким образом, установлено, что среди пациентов с гнойно-некротическими формами синдрома диабетической стопы, госпитализированных в стационары г. Красноярска распространены в основном генетические варианты MRSA, соответствующие клонам, выявленным ранее от пациентов с другими нозология-

ми на данной территории [19]. Установлено, что доминирующим клоном MRSA среди пациентов с гнойно-некротическими формами синдрома диабетической стопы, госпитализированных в правобережный и левобережный стационары крупного промышленного мегаполиса Западной Сибири являлся ST239/spa3(t037)/agrI/SCCmecIII.1.1.2(IIIА)/coaIV/tst+; характеризующийся высоким уровнем вирулентности и мультирезистентностью. Вторыми по значимости генетическими вариантами MRSA являлись ST8/spa1(t008)/agrI/SCCmecIV.3.1.1/CoaIII и ST12/spanew(t156)/agrI/SCCmecUT/coaVII; которые характеризовались устойчивостью к 1–2 группам антимикробных препаратов, помимо β-лактамов. Установлено, что среди от пациентов с гнойно-некротическими формами синдрома диабетической стопы, госпитализированных как в правобережный так и левобережный стационары г. Красноярска выделяются изоляты MRSA, преимущественно относящиеся к одним и тем же генетическим вариантам. Длительная госпитализация пациентов с данной патологией, а также их последующая неоднократная госпитализация в другие стационары г. Красноярска, способствует переносу госпитальных штаммов из одного стационара в другой. Данная ситуация определяет острую необходимость продолжения проведения мониторинга генетических вариантов MRSA и разработки системы противоэпидемиологических мероприятий по предотвращению распространения мультирезистентных вариантов MRSA среди больных с гнойно-некротическими формами синдрома диабетической стопы в стационаре.

Список литературы/References

1. Бахарев И.В., Редькин Ю.А. Синдром диабетической стопы: диагностика, лечение, профилактика. Качество жизни // Медицина. 2003. № 1. С. 35–38. [Bakharev I.V., Redkin Y.A. Syndrome diabetic foot: diagnosis, treatment, prevention. Quality of life. *Meditsina = Medicine*, 2003, no. 1, pp. 35–38. (In Russ.)]
2. Гостев В.В., Калиногорская О.С., Попенко Л.Н., Черенькая Т.В., Науменко З.С., Ворошилова Т.М., Захарова Ю.А., Хохлова О.Е., Круглов А.Н., Ершова М.Г., Молчанова И.В., Сидоренко С.В. Антибиотикорезистентность метициллинрезистентных *Staphylococcus aureus*, циркулирующих в Российской Федерации // Антибиотики и химиотерапия. 2015. Т. 60, № 1–2. С. 3–10. [Gostev V.V., Kalinogorskaya O.S., Popenko L.N., Chernenkaya T.V., Naumenko Z.S., Voroshilova T.M., Zakharova Y.A., Khokhlova O.E., Kruglov A.N., Ershova M.G., Molchanova I.V., Sidorenko S.V. Antibiotic resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* circulating in the Russian Federation. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*, 2015, vol. 60, no. 1–2, pp. 3–10. (In Russ.)]
3. Доброквашин С.В., Якупов Р.Р., Валеев А.З. Лечение больных с гнойно-некротическими осложнениями синдрома диабетической стопы // Акушерство. Гинекология. Эндокринология. 2011. Т. 54, № 6. С. 97–99. [Dobrokvashin S.V., Yakupov R.R., Valeev A.Z. Treatment of patients with purulent-necrotic complications of diabetic foot syndrome. *Akusherstvo. Ginekologiya. Endokrinologiya = Obstetrics. Gynecology. Endocrinology*, 2011, vol. 54, no. 6, pp. 97–99. (In Russ.)]
4. Митиш В.А., Пасхалова Ю.С., Ерошкин И.А., Галстян Г.Р., Блатун Л.А. Гнойно-некротические поражения при нейроишемической форме синдрома диабетической стопы // Хирургия. 2014. № 1. С. 48–53. [Mitish V.A., Paskhalova Yu.S., Eroshkin I.A., Galstyan G.R., Blatun L.A. Purulent-necrotic lesions in the neuroischemic form of the diabetic foot syndrome. *Hirurgiya = Surgery*, 2014, no. 1, pp. 48–53. (In Russ.)]
5. Попова Т.Е., Шнайдер Н.А., Петрова М.М., Говорина Ю.Б., Николаева Т.Я. Диагностика нарушений микроциркуляции у пациентов с преимущественно сенсорным вариантом хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатии: пилотное исследование // Сибирское медицинское обозрение. 2015. № 1. С. 32–37. [Popova T.E., Schneider N.A., Petrova M.M., Govorina Y.B., Nicolaeva T.Y. Diagnosis of microcirculatory disorders in patients with a predominantly sensory variant of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: a pilot study. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie = Siberian Medical Review*, 2015, no. 1, pp. 32–37. (In Russ.)]

6. Привольнев В.В., Решедько Г.К., Савкин В.А., Кречикова О.И. Структура возбудителей и их антибиотикорезистентность при инфекциях нижних конечностей у больных сахарным диабетом // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2009. Т. 11, № 1. С. 86–89. [Privolnev V.V., Reshedko G.K., Savkin V.A., Krechikova O.I. Structure of pathogens and their antibiotic resistance in infections of lower extremities in patients with diabetes mellitus. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2009, vol. 11, no. 1, pp. 86–89. (In Russ.)]
7. Рундо А.И. Современные аспекты этиологии и патогенеза синдрома диабетической стопы // Новости хирургии. 2015. Т. 23, № 1. С. 97–104. [Rundo A.I. Modern aspects of the etiology and pathogenesis of diabetic foot syndrome. *Novosti khirurgii = News of Surgery*, 2015, vol. 23, no. 1, pp. 97–104. (In Russ.)]
8. Токмакова А.Ю. Современная концепция диагностики и лечения хронических ран у больных с синдромом диабетической стопы // Сахарный диабет. 2009. № 1. С. 14–17. [Tokmakova A.Y. The modern concept of diagnosis and treatment of chronic wounds in patients with diabetic foot syndrome. *Sakharnyy diabet = Diabetes mellitus*, 2009, no. 1, pp. 14–17. (In Russ.)]
9. Фенотипическое определение Enterobacter – продуцентов β-лактамаз расширенного спектра: обзор и руководство по проведению испытаний. Европейское общество клинической микробиологии и инфекционных болезней // Клиническая микробиология и инфекционные заболевания. 2008. Т. 14 (Прил. 1). С. 90–103. [Phenotypic determination of Enterobacter – producers of extended-spectrum β-lactamases: a review and a test guide. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Klinicheskaya mikrobiologiya i infektsionnye zabolovaniya = Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2008, vol. 14 (attachment 1), pp. 90–103. (In Russ.)]
10. Bal A.M., Coombs G.W., Holden M.T., Lindsay J.A., Nimmo G.R., Tattevin P., Skov R.L. Genomic insights into the emergence and spread of international clones of healthcare-, community- and livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Blurring of the traditional definitions. *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, 2016, vol. 95–101, pp. 8–34. doi: 10.1016/j.jgar.2016.04.004
11. Cavanagh P., Lipsky B.A., Bradbury A.W., Botek G. Treatment for diabetic foot ulcers. *Lancet*, 2005, vol. 366, pp. 1725–1735. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67699-4
12. Drieux L., Brossier F., Sougakoff W., Jarlier V. Phenotypic detection of extended-spectrum β-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2008, vol. 14 (suppl. 1), pp. 90–103. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01846.x
13. Echaniz-Aviles G., Velazquez-Meza M.E., Vazquez-Larios Mdel R., Soto-Noguerón A., Hernández-Dueñas A.M. Diabetic foot infection caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (USA300). *J. Diabetes*, 2015, vol. 7 (6), pp. 891–892. doi: 10.1111/1753-0407.12324
14. Gostev V., Kruglov A., Kalinogorskaya O., Dmitrenko O., Khokhlova O., Yamamoto T., Lobzin Y., Ryabchenko I., Sidorenko S. Molecular epidemiology and antibiotic resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* circulating in the Russian Federation. *Infect. Genet. Evol.*, 2017, vol. 53, pp. 189–194. doi: 10.1016/j.meegid.2017.06.006
15. Hiramatsu K., Ito T., Tsubakishita S., Sasaki T., Takeuchi F., Morimoto Y., Katayama Y., Matsuo M., Kuwahara-Arai K., Hishinuma T., Baba T. Genomic basis for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Chemother.*, 2013, vol. 45, pp. 117–136. doi: 10.3947/ic.2013.45.2.117
16. International working group on the classification of staphylococcal cassette chromosome elements (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Agents Chemother.*, 2009, vol. 53, pp. 4961–4967. doi: 10.1128/AAC.00579-09
17. Jeffcoate W.J., Harding K.G. Diabetic foot ulcers. *Lancet*, 2003, vol. 361, no. 9368, pp. 1545–1551. doi: 10.1016/S0140-6736(03)13169-8
18. Kado C.I., Liu S.T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.*, 1981, vol. 145, pp. 1365–1373.
19. Khokhlova O.E., Hung W.C., Wan T.W., Iwao Y., Takano T., Higuchi W., Yachenko S.V., Teplyakova O.V., Kamshilova V.V., Kotlovsky Y.V., Nishiyama A., Reva I.V., Sidorenko S.V., Peryanova O.V., Reva G.V., Teng L.J., Salmina A.B., Yamamoto T. Healthcare- and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and fatal pneumonia with pediatric deaths in Krasnoyarsk, Siberian Russia: unique MRSA's multiple virulence factors, genome, and stepwise evolution. *PLoS One*, 2015, vol. 1, pp. 1–30. doi: 10.1371/journal.pone.0128017
20. Kondo Y., Ito T., Ma X.X., Watanabe S., Kreiswirth B.N., Etienne J., Hiramatsu K. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: rapid identification system for mec, ccr, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2007, vol. 51, pp. 264–274. doi: 10.1128/AAC.00165-06
21. Lindsay J.A. Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2010, vol. 300, pp. 98–103. doi: 10.1016/j.ijmm.2009.08.013
22. Morbach S., Müller E., Reike H., Risse A., Rügenapf G., Spraul M. Diabetic foot syndrome. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 2014, vol. 122, no. 7, pp. 416–424. doi: 10.1055/s-0034-1366455
23. Nelson A., Wright-Hughes A., Backhouse M.R., Lipsky B.A., Nixon J., Bhogal M.S., Reynolds C., Brown S. CODIFI (Concordance in Diabetic Foot Ulcer Infection): a cross-sectional study of wound swab versus tissue sampling in infected diabetic foot ulcers in England. *BMJ Open*, 2018, vol. 8 (1): e019437, pp. 1–12. doi: 10.1136/bmjopen-2017-019437
24. Post V., Wahl P., Uckay I., Ochsner P., Zimmerli W., Corvec S., Loiez C., Richards R.G., Moriarty T.F. Phenotypic and genotypic characterisation of *Staphylococcus aureus* causing musculoskeletal infections. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2014, vol. 304 (5–6), pp. 565–576. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.03.003
25. Prevost G., Jaulhac B., Piemont Y. DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, vol. 30, pp. 967–973.
26. Reveles K.R., Duhon B.M., Moore R.J., Hand E.O., Howell C.K. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* diabetic foot infections in a large academic hospital: implications for antimicrobial stewardship. *PLoS One*, 2016, vol. 24, no. 11 (8): e0161658. doi: 10.1371/journal.pone.0161658
27. Sorensen A.I., Toft N., Boklund A., Espinosa-Gongora C., Græsboell K., Larsen J., Halasa T. A mechanistic model for spread of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) within a pig herd. *PLoS One*, 2017, vol. 12, no. 11: e0188429, pp. 1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0188429

28. Takano T., Hung W.C., Shibuya M., Higuchi W., Iwao Y., Nishiyama A., Reva I., Khokhlova O.E., Yabe S., Ozaki K., Takano M., Yamamoto T. A new local variant (ST764) of the globally disseminated ST5 lineage of hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carrying the virulence determinants of community-associated MRSA. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2013, vol. 57, pp. 1589–1595. doi: 10.1128/AAC.01147-12
29. Tenover F.C., Arbeit R., Archer G., Biddle J., Byrne S., Goering R., Hancock G., Hébert G.A., Hill B., Hollis R. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, 1994, vol. 32, pp. 407–415.
30. Van der Zwaluw K., de Haan A., Pluister G.N., Bootsma H.J., de Neeling A.J., Schouls L.M. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 3: e0123690, pp. 1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0123690

Авторы:

Хохлова О.Е., к.б.н., доцент микробиологии им. доц. Б.М. Зельмановича ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия;

Ивао Я., PhD, научный сотрудник лаборатории молекулярной бактериологии Международного медицинского образовательно-исследовательского центра (IMERC), Ниигата, Япония;

Камшилова В.В., к.б.н., врач-бактериолог КГБУЗ Красноярская межрайонная клиническая больница скорой медицинской помощи им. Н.С. Карповича, г. Красноярск, Россия;

Теплякова О.В., к.м.н., доцент кафедры общей хирургии им. проф. М.И. Гульмана ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия; врач-хирург КГБУЗ Красноярская межрайонная клиническая больница № 7, г. Красноярск, Россия;

Мотова А.И., врач-клинический фармаколог КГБУЗ Красноярская межрайонная клиническая больница скорой медицинской помощи им. Н.С. Карповича, г. Красноярск, Россия;

Дробушевская А.И., к.м.н., врач-хирург КГБУЗ Красноярская межрайонная клиническая больница № 7, г. Красноярск, Россия;

Перьянова О.В., к.б.н., зав. кафедрой микробиологии им. доц. Б.М. Зельмановича ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия; руководитель Российско-Японского центра микробиологии, метагеномики и инфекционных заболеваний, г. Красноярск, Россия;

Винник Ю.С., д.м.н., профессор, зав. кафедрой общей хирургии им. проф. М.И. Гульмана, председатель диссертационного совета ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия;

Поткина Н.К., научный сотрудник, ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия; научный сотрудник Российско-Японского центра микробиологии, метагеномики и инфекционных заболеваний, г. Красноярск, Россия;

Здзитовецкий Д.Э., д.м.н., доцент, зав. кафедрой и клиникой хирургических болезней им. проф. Ю.М. Лубенского ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия; врач-хирург КГБУЗ Красноярская межрайонная клиническая больница № 7, г. Красноярск, Россия;

Ямамото Т., PhD, профессор, куратор Российско-Японского центра микробиологии, метагеномики и инфекционных заболеваний, г. Красноярск, Россия; директор Международного медицинского образовательно-исследовательского центра (IMERC), Ниигата, Япония.

Authors:

Khokhlova O.E., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology named after B.I. Zelmanovich, Krasnoyarsk State Medical University named after professor V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Iwao Y., PhD, Researcher, Laboratory of Molecular Bacteriology, International Medical Education and Research Center, Niigata, Japan;

Kamshilova V.V., PhD (Biology), Bacteriologist, Krasnoyarsk State Emergency Hospital named after N.S. Karpovich, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Teplyakova O.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of General Surgery named after M.I. Gulman, Krasnoyarsk State Medical University named after professor V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation; Surgeon, Krasnoyarsk State Municipal Clinical Hospital No. 7, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Motova A.I., Clinical Pharmacologist, Krasnoyarsk State Emergency Hospital named after N.S. Karpovich, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Drobusheskaya A.I., PhD (Medicine), Surgeon, Krasnoyarsk State Municipal Clinical Hospital No. 7, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Perianova O.V., PhD (Biology), Head of Department of Microbiology named after B.I. Zelmanovich, Krasnoyarsk State Medical University named after professor V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation; Director of Russian-Japan Center of Microbiology, Metagenomics and Infectious Diseases, Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Vinnik Y.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Department of General Surgery named after M.I. Gulman, Krasnoyarsk State Medical University named after professor V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Potkin N.K., Researcher, Krasnoyarsk State Medical University named after professor V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation; Researcher, Russian-Japan Center of Microbiology, Metagenomics and Infectious Diseases, Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Zdzitowiecki D.E., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Surgical Pathology named after Yu.M. Lubenskiy, Krasnoyarsk State Medical University named after professor V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation; Surgeon, Krasnoyarsk State Municipal Clinical Hospital No. 7, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Yamamoto T., PhD, Professor, Curator of Russian-Japan Center of Microbiology, Metagenomics and Infectious Diseases, Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation; Director of International Medical Education and Research Center, Niigata, Japan.

ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ ПРИ АНАЛИЗЕ ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ АНТИРАБИЧЕСКИХ СЫВОРОТОК И ИММУНОГЛОБУЛИНА

С.В. Генералов, А.Л. Кравцов, В.А. Кожевников, Ю.К. Гаврилова, Е.Г. Абрамова,
А.К. Никифоров

ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов,
Россия

Резюме. В настоящем исследовании рассматривается разработка метода определения уровня антирабических антител в иммунных сыворотках и препарате иммуноглобулина с использованием проточной цитометрии. Метод основан на измерении уровня флуоресценции в клетках Vero, инкубированных в питательной среде с добавлением смеси разведений антирабических сывороток или препарата иммуноглобулина и аттенуированного штамма вируса бешенства «Москва 3253», адаптированного к репродукции на перевиваемых клеточных линиях. Для определения уровня антител образцы антирабических сывороток и иммуноглобулина следует разводить в солевом растворе соответственно в 20 и 200 раз. При этом рекомендуемая доза вируса должна составлять 0,1 ИД₅₀ на 1 клетку. Для фиксации и пермеабилзации клеточной мембраны применяли реагент Cytoperm/Cytofix (BD Pharmingen, США), содержащий формальдегид. Этот компонент способен инактивировать вирус бешенства, что позволяет считать предлагаемый метод соответствующим принципам биологической безопасности. Для окрашивания предлагается использовать конъюгат антирабического иммуноглобулина с ФИТЦ (ФГБУ ВНИИЗЖ, Россия). Данное обстоятельство не ограничивает применение аналогичных препаратов, предназначенных для этой цели. Цитометрические исследования осуществляли на проточном цитометре, снаряженным аргоновым лазером мощностью 20 МВт, при длине волны эмиссии 488 нм со скоростью 500 клеток в секунду. Инфицированными считали те клетки, значения интенсивности флуоресценции которых составили более 10 условных единиц. Использование проточной цитометрии позволяет определить точное количество инфицированных клеток в исследуемой суспензии, а также степень их инфицирования по интенсивности флуоресценции. Уровень содержания антител в исследуемых образцах учитывают по калибровочному графику, построенному на основании данных исследования стандартного образца активности антирабического иммуноглобулина, имеющего активность 30 МЕ в 1 мл (NIBSC, Великобритания). Установлена высокая степень корреляции результатов, полученных с помощью предлагаемого метода в сравнении с результатами, полученных и других методов определения активности антирабических препаратов — биологической реакции нейтрализации вируса на белых мышах (0,92) и модифицированного метода FAVN (0,98). При этом сравнение результатов анализа уровня антирабических антител, полученных с применением проточной цитометрии, и результатов, полученными в тестах *in vivo*, проведено впервые. Возможность быстрого

Адрес для переписки:

Генералов Сергей Вячеславович
410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, 46,
ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный
институт «Микроб».
Тел.: 8 (452) 26-21-31.
E-mail: svgeneraloff@gmail.com

Contacts:

Sergei V. Generalov
410005, Russian Federation, Saratov, Universitetskaya str., 46,
Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe".
Phone: +7 (452) 26-21-31.
E-mail: svgeneraloff@gmail.com

Библиографическое описание:

Генералов С.В., Кравцов А.Л., Кожевников В.А., Гаврилова Ю.К.,
Абрамова Е.Г., Никифоров А.К. Проточная цитометрия при анализе
вируснейтрализующей активности антирабических сывороток
и иммуноглобулина // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 1. С. 107–114.
doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-107-114

Citation:

Generalov S.V., Kravtsov A.L., Kozhevnikov V.A., Gavrilova Yu.K.,
Abramova E.G., Nikiforov A.K. Flow cytometry for the analysis
of virusneutralizing activity of antirabies serum and immunoglobulin drug //
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019,
vol. 9, no. 1, pp. 107–114. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-107-114

получения результата, а также точного определения степени инфицирования клеток по интенсивности флуоресценции позволит использовать предлагаемый метод на этапах контроля в производстве разрабатываемых и выпускаемых иммунобиологических антирабических препаратов.

Ключевые слова: вирус бешенства, антирабический иммуноглобулин, антирабическая сыворотка, вируснейтрализующая активность, проточная цитометрия, контроль биопрепаратов.

FLOW CYTOMETRY FOR THE ANALYSIS OF VIRUS NEUTRALIZING ACTIVITY OF ANTIRABIES SERUM AND IMMUNOGLOBULIN DRUG

Generalov S.V., Kravtsov A.L., Kozhevnikov V.A., Gavrilova Yu.K., Abramova E.G., Nikiforov A.K.

Russian Anti-Plague Research Institute «Microbe» of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, Saratov, Russia

Abstract. Here, we discuss development of flow cytometry technique for determining level of rabies antibodies in immune sera and immunoglobulin preparations, which is based on measuring fluorescence level in Vero cell line added with a mix of serially diluted anti-rabies serum or immunoglobulin preparation together with Moscow 3253 attenuated rabies virus strain, adapted for reproduction in cell lines. For this, rabies sera and immunoglobulin preparation were diluted 1:20 and 1:200 with PBS, respectively, whereas rabies virus was recommended for use at dose of 0.1 ID₅₀/cell. Cell membrane fixation and permeabilization were performed by using a Cytoperm/Cytofix reagent (BD Pharmingen, USA) containing formaldehyde able to inactivate rabies virus, thus complying with biological safety regulations. Anti-rabies FITC-conjugated immunoglobulin (FGBI АРРІАН, Russia) was recommended for staining, that does not limit using similar reagents. Then, a flow cytometer equipped with a 20 mW argon laser (488 nm emission wavelength, throughput — 500 cells per second) was used for analysis. Vero cells displaying a fluorescence intensity exceeding 10 arbitrary units were considered infected. Flow cytometry allows to precisely measure amount of experimental infected cells as well as degree of infection by evaluating cell fluorescence intensity. Amount of antibodies in the samples examined by us was calculated by building a calibration curve based on depicting data for a standard rabies immunoglobulin with activity of 30 IU/ml (NIBSC, Potters Bar, United Kingdom). A high correlation between the data obtained by us and results from other detection methods used to assess activity of anti-rabies preparations such as biological neutralization of rabies virus in white mice (0.92) and modified FAVN test (0.98) was demonstrated. The comparison of the results of the analysis of the level of rabies antibodies obtained using flow cytometry, and the results obtained in tests *in vivo*, was carried out for the first time. Moreover, it is worth noting that for the first time the level of anti-rabies antibodies assessed by flow cytometry and *in vivo* tests was compared. An opportunity to perform rapid and easy-to-do analysis on assessing amount of infected cells by measuring fluorescence intensity in flow cytometry assay would allow to apply this approach for quality control while developing and manufacturing immunobiological anti-rabies preparations.

Key words: rabies virus, rabies immunoglobulin, rabies serum, neutralizing activity, flow cytometry, control of biologics.

Введение

Антирабический иммуноглобулин из сыворотки крови лошади, используемый для постэкспозиционной профилактики бешенства, в Российской Федерации является одним из самых востребованных из спектра иммунобиологических лекарственных препаратов для профилактики бактериальных и вирусных инфекций. Подобная востребованность вызвана напряженной эпизоотической обстановкой, сохраняющейся в последние десятилетия, и высоким количеством обращающихся за антирабической помощью, которое составляет от 200 до 400 тыс. человек в год [6].

Способность к формированию пассивного иммунитета с момента укуса до начала выработки активного иммунитета (7–8 сут) напрямую связана с одной из важнейших характеристик препарата — специфической (вируснейтрализующей) активностью антирабического иммуноглобулина, которая, согласно требованиям Всемирной орга-

низации здравоохранения (ВОЗ), должна составлять не менее 150 МЕ в 1 мл [14].

В настоящее время при производстве антирабического иммуноглобулина определение специфической активности осуществляют в реакции нейтрализации на белых мышьях [12]. Этот метод является высокочувствительным и рекомендован ВОЗ [14]. С другой стороны, данный метод отличается трудоемкостью и длительностью, поскольку подразумевает интрацеребральное введение смеси вирусосодержащей жидкости и антирабического препарата большому количеству белых мышьях и учет результата в течение 14–21 сут [12].

Альтернативным решением, устраняющим указанные недостатки, является проведение анализа на клеточных культурах с использованием метода иммунофлуоресценции [1, 9]. Основой метода является учет инфицированных вирусом бешенства клеток после окрашивания специфическими флуоресцирующими антителами с помощью люминесцентной микроскопии.

Логичным развитием методических подходов определения специфической активности противовирусных препаратов с помощью люминесцентной микроскопии является использование проточной цитометрии, позволяющей дать более точную оценку количества инфицированных вирусом клеток. В зарубежной литературе описано обнаружение вируса бешенства и определение уровня антирабических антител в крови вакцинированных животных методом проточной цитометрии [10, 13] с применением клеток мышечной нейробластомы (MNA) и почек сирийского хомяка (ВНК-21). Сведения о применении проточной цитометрии для обнаружения вируса бешенства, представленные в отечественной литературе, ограничены только собственными исследованиями [4]. Данные об использовании проточной цитометрии при определении специфической активности антирабических профилактических препаратов на сегодняшний день отсутствуют.

Целью настоящей работы явилась разработка метода, основанного на использовании проточной цитометрии, для определения уровня специфических антител в антирабических сыворотках лошадей и препарате гетерологичного антирабического иммуноглобулина, полученного из указанных сывороток.

Материалы и методы

Вирусы. Штаммы фиксированного вируса бешенства «Москва 3253» (номер депозита 61/91, пассаж 3) и CVS (номер депозита 80/06, пассаж 3) получены из коллекции ФГБУ НЦЭСМП (Москва, Россия). Штамм «Москва «3253» был адаптирован к репродукции в клетках Vero с использованием питательных сред Игла MEM и 199 (ООО «Биолот», Россия) с добавлением 5 % сыворотки КРС (ООО «Биолот», Россия).

Клетки. Клеточная перевиваемая линия Vero (клетки почки африканской зеленой мартышки) получена из коллекции ООО «Биолот» (Россия). Выращивание клеточной культуры осуществляли на среде Игла MEM (ООО «Биолот», Россия) с добавлением 10% сыворотки КРС (ООО «Биолот», Россия).

Антирабические сыворотки и иммуноглобулины. В работе использовали антирабические сыворотки, полученные из крови гипериммунизированных лошадей и используемые в качестве исходного сырья для производства препарата антирабического иммуноглобулина. Также осуществляли исследование специфической активности образцов готового препарата «Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий, раствор для инъекций» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора).

Реакцию нейтрализации вируса бешенства на белых мышах осуществляли согласно рекомендациям ВОЗ [12] с использованием штамма вируса бешенства CVS. Расчет результатов про-

водили с помощью метода Рида и Менча [12] с использованием программы для ЭВМ, разработанной для этой цели [3].

Определение вируснейтрализующей активности антирабических сывороток и иммуноглобулина на культуре клеток с применением люминесцентного микроскопа («Микромед», Россия) и инфицирующей дозы вируса для клеточных культур (ИД₅₀) осуществляли в соответствии с предыдущими исследованиями [2].

При **определении вируснейтрализующей активности** антирабических сывороток и иммуноглобулина на культуре клеток с применением проточной цитометрии принимали во внимание рекомендации, разработанные Bordignon и Vengatesan [11, 13], а также результаты предыдущих собственных исследований [4].

Разведения вируса, а также исследуемых образцов сывороток и иммуноглобулина готовили на питательной среде Игла MEM или 199. К 0,5 мл исследуемого образца сыворотки или иммуноглобулина добавляли равный объем рабочего разведения вируса бешенства штамма «Москва 3253». Смесь инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Затем смесь переносили в 6-луночные планшеты (Costar, США) для культивирования клеток и добавляли 0,5 мл суспензии клеток Vero в концентрации $(3 \pm 1) \times 10^5$ кл/мл. Культуру клеток инкубировали в течение 72 ч, а затем осуществляли цитометрическое исследование. Аналогично готовили положительный и отрицательный контрольные образцы. Положительным контрольным образцом являлась клеточная суспензия, инфицированная вирусом бешенства без добавления антирабических сывороток или иммуноглобулина. Отрицательным контрольным образцом являлись интактные клетки.

Для проведения **анализа клеточной суспензии на проточном цитометре CyAn ADP Cytometry (Дания)** клетки прикрепляли от поверхности планшета с помощью раствора трипсина и версена [8] и суспендировали в растворе DPBS (ООО «Биолот», Россия). Затем с помощью набора Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, США) осуществляли фиксацию и пермеабиллизацию клеток [13]. Иммунофлуоресцентное окрашивание антигена в клеточной цитоплазме осуществляли диагностическим антирабическим иммуноглобулином, конъюгированным с флуоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ) (ВНИИЗЖ, г. Владимир). При работе использовали рабочее разведение диагностического препарата, рекомендованное производителем для проведения анализов с применением люминесцентной микроскопии. Образцы анализировали со скоростью около 500 клеток в секунду на проточном цитометре, снаряженным арговым лазером мощностью 20 МВт, при длине волны эмиссии 488 нм. Для ведения протокола анализа использовали программное обеспечение Summit 4.3 Built 2445. Настройки про-

граммы устанавливали таким образом, чтобы на цитограммах по параметрам интенсивности прямого (FS) и бокового (SS) светорассеяния неповрежденные живые клетки Vero отличались от клеточного дебриса и погибших клеток, имеющими характерные изменения клеточного размера и внутриклеточной структуры [7]. Область интенсивности флуоресценции, соответствующую инфицированным клеткам, идентифицировали в окне Dot Plot SS/FITC FL [13] путем повышения высоковольтного напряжения на фотодетекторе до величины (300 ± 40) В. Значения интенсивности флуоресценции в данной области составили более 10 условных единиц. Долю инфицированных клеток определяли как процентное отношение числа клеток, зарегистрированных в этой области, к общему числу исследованных клеточных элементов.

Расчет вируснейтрализующей активности исследуемых образцов осуществляли по результатам цитометрического анализа разведений второго стандартного образца активности антирабического иммуноглобулина, имеющего активность 30 МЕ в 1 мл (NIBSC, Великобритания). Из указанного стандартного образца готовили двукратные разведения с активностью от 0,02 до 3,0 МЕ в 1 мл. К полученным разведениям добавляли клетки и вирус, а затем проводили цитометрический анализ, как описано в предыдущих разделах настоящей статьи. Полученные результаты использовали для построения калибровочного графика, определяющего зависимость индекса ингибирования инфекции от содержания вируснейтрализующих антител. Индекс ингибирования инфекции для каждо-

го образца рассчитывали при сравнении с процентным содержанием инфицированных клеток в положительном контрольном образце:

$$I = \left(1 - \frac{N_i}{N_k}\right) \times 100\%,$$

где I — индекс ингибирования инфекции; N_i — количество инфицированных клеток в исследуемом образце; N_k — количество инфицированных клеток в положительном контрольном образце.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли по стандартным общепринятым методам [5].

Результаты

На первом этапе исследования подбирали оптимальную начальную инфицирующую дозу вируса бешенства. Вирусосодержащую жидкость добавляли к суспензии клеток Vero в дозе 0,01; 0,1 и 1 ИД₅₀ на 1 клетку. Конечная концентрация клеток Vero в исследуемой суспензии составила от 0,8 до $1,2 \times 10^5$ клеток в 1 мл.

Согласно результатам, представленным на рисунке 1, добавление вируса к клеткам в дозе 0,1 ИД₅₀ на 1 клетку через 72 ч приводило к появлению $(74,1 \pm 6,2)\%$ инфицированных клеток в общей популяции. Увеличение дозы заражения до 1 ИД₅₀ на 1 клетку не приводило к заметному возрастанию доли инфицированных клеток, а добавление вируса концентрации 0,01 ИД₅₀ на 1 клетку является недостаточным для использования при определении уровня антирабических антител. Таким образом, для последующих экспериментов, связанных с анализом содержания специфических антител, использовали дозу вируса 0,1 ИД₅₀ на 1 клетку.

На следующем этапе исследования определяли зависимость индекса ингибирования инфекции от содержания вируснейтрализующих антител с использованием второго международного стандарта специфической активности человеческого иммуноглобулина. Цитометрический анализ клеточной суспензии проводили через 72 ч после добавления смеси вируса и антител к клеточной культуре. Примеры цитограмм показаны на рисунке 2.

Результаты исследования ряда последовательных разведений стандартного образца представлены на рисунке 3. Полученную зависимость индекса ингибирования инфекции при репродукции вируса в клеточной культуре Vero от исходного содержания антител в образце использовали в качестве калибровочного графика при обработке результатов, полученных при исследовании образцов сыворотки и иммуноглобулинов с неизвестным содержанием антител. Для определения уровня антител с применением проточной цитометрии образцы антирабических сывороток и иммуноглобулина предва-

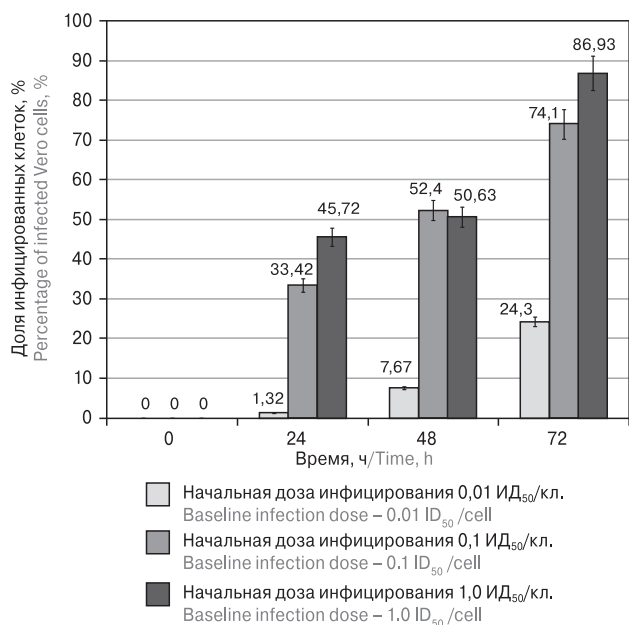


Рисунок 1. Зависимость доли инфицированных клеток Vero от начальной дозы инфицирования
Figure 1. Baseline infection dose/percentage infected Vero cells ratio

рительно разводили в солевом растворе соответственно в 20 и 200 раз. Далее фактор разведения учитывали при расчетах конечного значения специфической активности исследуемого образца, которое выражали в МЕ/мл.

Результаты сравнительного исследования образцов антирабических сывороток и иммуноглобулина представлены в таблице. Полученные значения специфической активности сопоставляли с аналогичными показателями, получен-

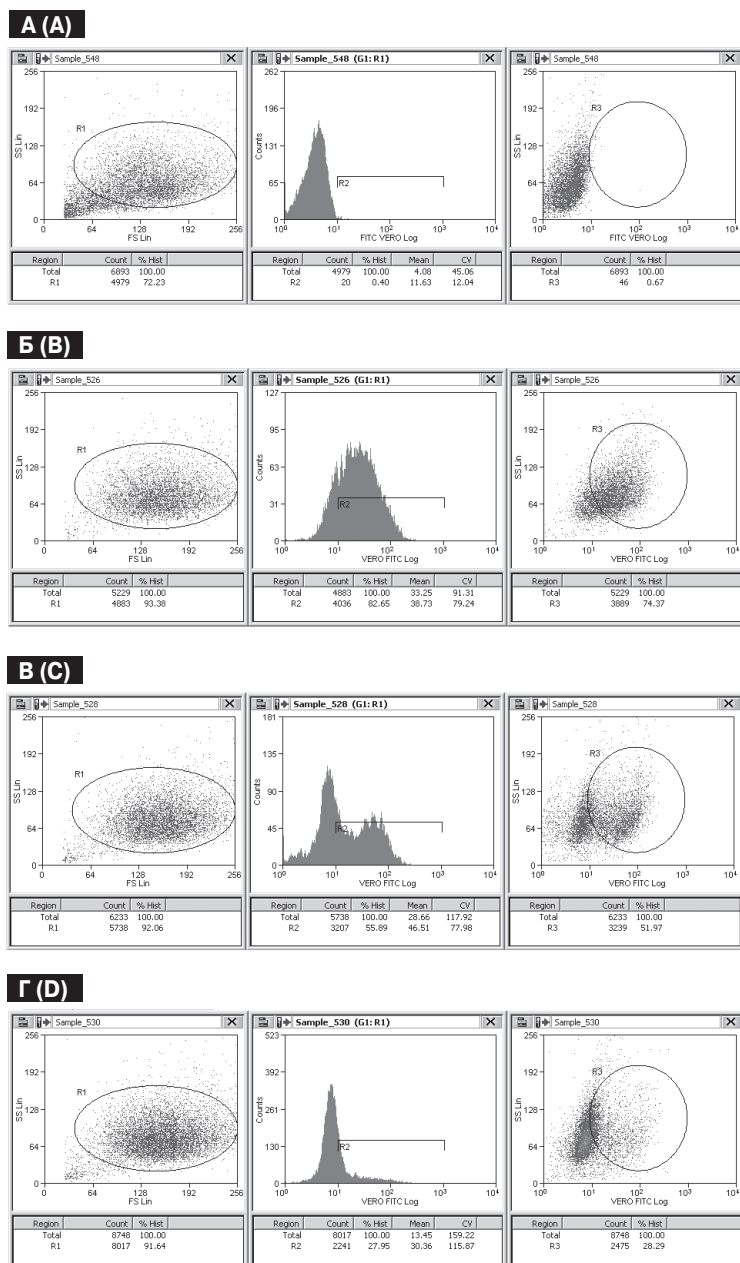


Рисунок 2. Цитограммы клеточной культуры Vero

Figure 2. Vero cell cytograms

Примечание. Области, содержащие инфицированные клетки, обозначены на цитограмме маркерами R1, R2 и R3.

A) интактная клеточная культура без добавления антирабического иммуноглобулина и вируса бешенства (отрицательный контроль); Б) клеточная культура, инфицированная рабочим разведением вируса бешенства (положительный контроль); В) клеточная культура, инфицированная смесью, содержащей рабочее разведение вируса бешенства и антирабические антитела в концентрации 1,0 МЕ/мл; Г) клеточная культура, инфицированная смесью, содержащей рабочее разведение вируса бешенства и антирабические антитела в концентрации 2,0 МЕ/мл.

Note. Regions depicting infected Vero cells are denoted by R1, R2 and R3 markers.

A) intact cells added with no rabies immunoglobulin and rabies virus (negative control); B) cells infected with rabies virus at optimal dilution (positive control); C) cells infected with rabies virus at optimal dilution added with 1.0 IU/ml rabies antibodies; D) cells infected with rabies virus at optimal dilution added with 2.0 IU/ml rabies antibodies.

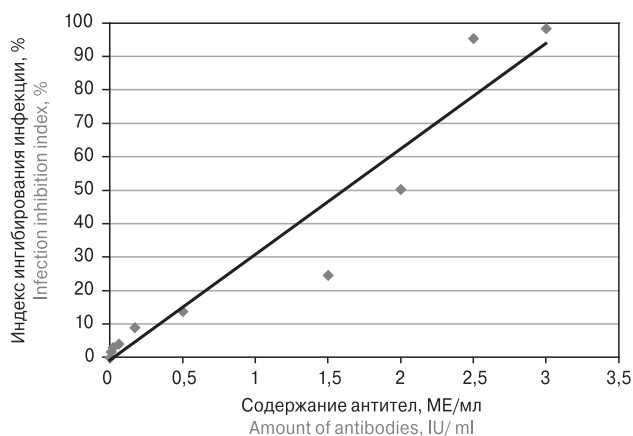


Рисунок 3. Зависимость индекса ингибирования инфекции от содержания антирабических антител

Figure 3. A relationship between an infection inhibition index and rabies antibody level

Таблица. Сравнение специфической активности антирабических сывороток и антирабического иммуноглобулина при исследовании методами *in vivo* и *in vitro*

Table. Specific activity of antirabies serum vs. immunoglobulin preparation examined by using *in vivo* and *in vitro* methods

Образец Sample	Специфическая активность образцов, МЕ/мл Sample-specific activity, IU/ml		
	Проточная цитометрия Flow cytometry	Люминесцентная микроскопия Fluorescent microscopy	Реакция нейтрализации на белых мышах Neutralization of rabies virus in white mice
Антирабическая сыворотка, образец 1 Antirabies serum, sample 1	8	18	16
Антирабическая сыворотка, образец 2 Antirabies serum, sample 2	10	12	19
Антирабическая сыворотка, образец 3 Antirabies serum, sample 3	12	20	20
Антирабическая сыворотка, образец 4 Antirabies serum, sample 4	24	16	12
Антирабический иммуноглобулин, образец 5 Antirabies immunoglobulin, sample 5	420	323	223
Антирабический иммуноглобулин, образец 6 Antirabies immunoglobulin, sample 6	250	199	164
Антирабический иммуноглобулин, образец 7 Antirabies immunoglobulin, sample 7	380	343	242
Антирабический иммуноглобулин, образец 8 Antirabies immunoglobulin, sample 8	210	199	170
Антирабический иммуноглобулин, образец 9 Antirabies immunoglobulin, sample 9	260	222	170
Антирабический иммуноглобулин, образец 10 Antirabies immunoglobulin, sample 10	240	202	159
Антирабический иммуноглобулин, образец 11 Antirabies immunoglobulin, sample 11	320	269	212
Антирабический иммуноглобулин, образец 12 Antirabies immunoglobulin, sample 12	360	272	154

Примечание. Коэффициент корреляции при сравнении результатов, полученных методами с применением проточной цитометрии и реакции нейтрализации на белых мышах — 0,92; коэффициент корреляции при сравнении результатов, полученных методами с применением проточной цитометрии и люм-микроскопии — 0,98.

Note. A correlation coefficient calculated by comparing the data obtained by using flow cytometry vs. neutralization reaction in white mice or flow cytometry vs. fluorescent microscopy was 0.92 and 0.98, respectively.

ными с использованием реакции нейтрализации на белых мышах [12] и модифицированного метода иммунофлуоресценции [2].

Обсуждение

Определение вируснейтрализующих антител является одной из распространенных задач в исследованиях, связанных с диагностикой иммунитета у людей и животных, а также контролем качества антирабических препаратов. Результаты анализа содержания защитных антител позволяют в конечном итоге сделать выводы об иммуногенности вакцин или о способности сывороточных препаратов обеспечивать пассивный иммунитет.

В настоящем исследовании предложен подход для определения специфической активности антирабических сывороток и иммуноглобулина, предназначенного для постэкспозиционной профилактики бешенства. Исследование со-

держания нейтрализующих антител основано на применении проточной цитометрии.

Положительные результаты применения цитометрического анализа для определения нейтрализующей способности сывороток к вирусу бешенства подробно описаны в зарубежной литературе [11, 13].

Особенностью предлагаемого метода является использование культуры клеток Vero и фиксированного штамма вируса бешенства «Москва 3253», адаптированного к репродукции в клетках этой линии. Ранее указанные культура клеток и штамм нашли успешное применение при разработке метода определения вируснейтрализующей активности антирабических сывороток и иммуноглобулина с учетом результатов с помощью люминесцентной микроскопии [2]. Более того, для обнаружения инфицированных клеток предложено использование конъюгата антирабического иммуноглобулина с ФИТЦ, произведенного в России (ВНИИЗЖ, г. Владимир). Этот диагностикум был успешно применен в предыдущих исследованиях по обнаружению клеток, инфицированных вирусом бешенства, с использованием проточной цитометрии [4]. Тем не менее, данное обстоятельство не ограничивает использование аналогичных препаратов, предназначенных для этой цели.

На этапе пермеабилзации клеточной мембраны, необходимом для дальнейшего обнаружения внутриклеточных антигенов вируса, использовали реагент Cytoperm/Cytofix (BD Pharmingen, США), зарекомендованный зарубежными исследователями [10, 13]. Формальдегид, входящий в состав этого реагента, полностью инактивирует вирус бешенства, что позволяет считать предлагаемый метод соответствующим принципам биологической безопасности.

Активность антирабических сывороток и иммуноглобулина определяли с помощью калибровочного графика, построенного на данных исследования ряда разведений стандартного образца иммуноглобулина с известным содержанием антител, сравнивая индекс ингибиции инфекции изучаемого образца со значениями данного показателя на графике.

Для анализа исследуемых образцов сывороток и иммуноглобулина использовали соответственно 20- и 200-кратные разведения. В этом случае ожидаемое содержание вируснейтрализующих антител в разведении исследуемого образца находилось в диапазоне от 0,75 до 1,5 МЕ в 1 мл.

Изменение содержания антител в разведении приводило к усложнению интерпретации результатов. Например, при смешивании равных объемов разведения иммуноглобулина, содержащего антитела более 2,5 МЕ в 1 мл и вирусосодержащей жидкости с активностью 0,1 ИД₅₀ в 1 мл наблюдали практически полную нейтрализацию образца вируса бешенства, что проявлялось в уменьшении количества инфицированных клеток до 1–2%. Значительное увеличение кратности разведения исследуемого образца сыворотки или иммуноглобулина, так же как и увеличение активности вирусосодержащей жидкости до значения более 1 ИД₅₀ в 1 мл, приводило к увеличению количества инфицированных клеток до 60–70%, что сопоставимо с результатами анализа положительного контрольного образца.

В отличие от аналогичных работ зарубежных исследователей [11, 13], в настоящем исследовании впервые приведено сравнение результатов, полученных с помощью проточной цитометрии, с результатами, полученными при определении активности антирабических препаратов в реакции нейтрализации на белых мышах. При сравнении результатов указанных тестов, установлен высокий коэффициент корреляции, равный 0,92, что позволяет рекомендовать предлагаемый метод для практического применения, особенно на этапе промежуточного контроля иммунных сывороток, предполагающего исследование большого количества образцов. При сравнении предлагаемого метода и разработанного ранее модифицированного метода иммунофлуоресценции [2], также установлен высокий коэффициент корреляции, равный 0,98.

На наш взгляд, для анализа большого количества образцов использование проточной цитометрии представляется наиболее перспективным благодаря возможности автоматического учета результата с достаточно высокой точностью.

Список литературы/References

1. Вишняков И.Ф., Недосеков В.В., Груздев К.Н., Балышев В.М., Жестерев В.И., Горшкова Т.Ф. Способ определения антирабических вируснейтрализующих антител. Патент РФ 2130187. Оpubл. 10.05.1999. [Vishnjakov I.F., Nedosekov V.V., Gruzdev K.N., Balyshev V.M., Zhesterev V.I., Gorshkova T.F. Method of assay of antirabies virus-neutralizing antibodies. Patent RF 2130187. Publ. 10.05.1999. (In Russ.)]
2. Гаврилова Ю.К., Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Савицкая Л.В., Галкина М.В., Кочкин А.В. Экспресс-анализ активности антирабических сывороток и иммуноглобулина в клеточных культурах методом иммунофлуоресценции // Биотехнология. 2018. Т. 34, № 4. С. 83–88. [Gavrilova Yu.K., Generalov S.V., Abramova E.G., Savitskaya L.V., Galkina M.V., Kochkin A.V. Express analysis of activity of anti-rabies serum and anti-rabies immunoglobulin in cell cultures by immunofluorescence method. *Biotechnologiya = Biotechnology*, 2018, vol. 34, no. 4, pp. 83–88. doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-4-83-88 (In Russ.)]
3. Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Савицкая Л.В., Лобовикова О.А., Никифоров А.К. Программа для расчета результатов реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышах по методу Рида и Менча. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2016617051. 23 июня 2016 г. [Generalov S.V., Abramova E.G., Savitskaya L.V.,

- Lobovikova O.A., Nikiforov A.K. The program for calculating the results of the neutralization reaction of rabies virus on white mice according to the method of Reed and Muench. Certificate of state registration of the computer program. No. 2016617051. June 23, 2016 (In Russ.)
4. Кравцов А.Л., Генералов С.В., Кожевников В.А., Гаврилова Ю.К., Абрамова Е.Г., Кочкин А.В., Никифоров А.К. Определение доли инфицированных вирусом бешенства клеток линии Vero с помощью проточной цитометрии // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2018. № 3. С. 18–25. [Kravtsov A.L., Generalov S.V., Kozhevnikov V.A., Gavrilova Yu.K., Abramova E.G., Kochkin A.V., Nikiforov A.K. Determination of the rabies virus infected Vero line cell portion by flow cytometry. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2018, no. 3, pp. 18–25. (In Russ.)]
 5. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с. [Lakin G.F. Biometry. Moscow: High school, 1990. 352 p. (In Russ.)]
 6. Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Пакскина Н.Д., Писцов М.Н., Рубцов В.В., Суровяткин А.В., Петров А.А., Казанцев А.В., Бережной А.М., Зверев А.Ю., Маношкин А.В., Кротков В.Т., Кутаев Д.А., Максимов В.А., Кузнецов С.Л., Вахнов Е.Ю., Тимофеев М.А., Мовсесянц А.А., Борисевич С.В. Эпидемиологическая обстановка и вопросы идентификации вируса бешенства среди людей на территории Российской Федерации в период 2002–2015 гг. // Проблемы особо опасных инфекций. 2017. № 3. С. 27–32. [Onishchenko G.G., Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Paksina N.D., Pistsov M.N., Rubtsov V.V., Surovyatkin A.V., Petrov A.A., Kazantsev A.V., Berzhnoy A.M., Zverev A.Yu., Manoshkin A.V., Krotkov V.T., Kutaev D.A., Maksimov V.A., Kuznetsov S.L., Vakhnov E.Yu., Timopheev M.A., Movsesyants A.A., Borisevich S.V. Epidemiological situation and problems of identification of rabies virus in humans in the territory of the Russian Federation during the period of 2002–2015. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2017, no. 3, pp. 27–32. doi: 10.21055/0370-1069-2017-3-27-32 (In Russ.)]
 7. Сибиряк С.В., Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Оценка апоптоза в иммунологических исследованиях. Вопросы современной проточной цитометрии. Клиническое применение. Челябинск: Бумажный двор, 2008. 195 с. [Sibiryak S.V., Khaidukov S.V., Zurochka A.V. Evaluation of apoptosis in immunological studies. Issues of modern flow cytometry. Clinical application. *Chelyabinsk: Paper yard*, 2008. 195 p. (In Russ.)]
 8. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. 691 с. [Freshney R.Y. Culture of animal cells: a practical guide. Moscow: BINOM. Laboratory of Knowledge, 2010. 691 p. (In Russ.)]
 9. Bedekovic T., Lemo N., Lojic I., Mihaljevic Z., Jungic A., Cvetnic Z., Sac Z., Hostnik P. Modification of the fluorescent antibody virus neutralization test — elimination of the cytotoxic effect for the detection of rabies virus neutralising antibodies. *J. Virol. Methods*, 2013, vol. 189, no. 1, pp. 204–208. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.01.022
 10. Bordignon J., Ferreira S., Caporale G., Carreri M.L., Kotait I., Lima H.C. Zanetti C.R. Flow cytometry assay for intracellular rabies virus detection. *J. Virol. Methods*, 2002, vol. 105, no. 1, pp. 181–186. doi: 10.1016/S0166-0934(02)00064-2
 11. Bordignon J., Comin F., Ferreira S., Caporale G., Lima Filho J.H., Zanetti C.R. Calculating rabies virus neutralizing antibodies titres by flow cytometry. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 2002, vol. 44, no. 3, pp. 151–154.
 12. Meslin F.-X., Kaplan M.M., Koprowski H. Laboratory techniques in rabies. 4th ed. Geneva, Switzerland: WHO, 1996, 476 p.
 13. Vengatesan D., Raj G.D., Raja A., Ramadass P., Gunaseelan L. Detection of rabies virus antigen or antibody using flow cytometry. *Cytometry*. 2006, vol. 70B, no. 5, pp. 335–343. doi: 10.1002/cyto.b.20104
 14. WHO Expert Consultation on Rabies: second report. WHO technical report series 982. Geneva, Switzerland, 2013, 139 p.

Авторы:

Генералов С.В., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории профилактических иммуноглобулинов отдела профилактических препаратов ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;

Кравцов А.Л., д.б.н., ведущий научный сотрудник отдела иммунологии ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;

Кожевников В.А., младший научный сотрудник отдела иммунологии ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;

Гаврилова Ю.К., научный сотрудник лаборатории профилактических иммуноглобулинов отдела профилактических препаратов ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;

Абрамова Е.Г., д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории профилактических иммуноглобулинов отдела профилактических препаратов ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;

Никифоров А.К., д.б.н., зам. директора по экспериментальной и производственной работе ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия.

Authors:

Generalov S.V., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Prophylactic Immunoglobulins of the Department of Preventive Drugs, Russian Anti-Plague Research Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation;

Kravtsov A.L., PhD (Biology), Leading Researcher, Department of Immunology, Russian Anti-Plague Research Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation;

Kozhevnikov V.A., Junior Researcher, Department of Immunology, Russian Anti-Plague Research Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation;

Gavrilova Yu.K., Researcher, Laboratory of Prophylactic Immunoglobulins of the Department of Preventive Drugs, Russian Anti-Plague Research Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation;

Abramova E.G., PhD, MD (Biology), Head Researcher, Laboratory of Prophylactic Immunoglobulins of the Department of Preventive Drugs, Russian Anti-Plague Research Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation;

Nikiforov A.K., PhD, MD (Biology), Deputy Director of the experimental and production work, Russian Anti-Plague Research Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation.

Поступила в редакцию 09.11.2018
Отправлена на доработку 11.03.2019
Принята к печати 13.03.2019

Received 09.11.2018
Revision received 11.03.2019
Accepted 13.03.2019

ОСОБЕННОСТИ ФЕНОТИПА Т-ЛИМФОЦИТОВ В ДИНАМИКЕ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОГО ПЕРИОДА У БОЛЬНЫХ ПЕРИТОНИТОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИСХОДА ЗАБОЛЕВАНИЯ

А.А. Савченко^{1,2}, А.Г. Борисов^{1,3}, Д.В. Черданцев³, О.В. Первова³, И.В. Кудрявцев⁴,
В.Д. Беленюк¹

¹ ФГБНУ Федеральный исследовательский центр Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук, обособленное подразделение НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия

² ФГАОУ ВО Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, Россия

³ ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, г. Красноярск, Россия

⁴ ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Целью исследования явилось изучение фенотипического состава Т-лимфоцитов крови в динамике послеоперационного периода у больных распространенным гнойным перитонитом (РГП) в зависимости от исхода заболевания. Обследовано 36 пациентов с острыми хирургическими заболеваниями и травмами органов брюшной полости, осложнившимися РГП, в возрасте 30–65 лет. Забор крови производили перед операцией (дооперационный период), а также на 7, 14 и 21 сутки послеоперационного периода. В качестве контроля обследовано 40 относительно здоровых людей аналогичного возрастного диапазона. Исследование фенотипа Т-лимфоцитов крови проводили методом 5-цветной проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови. По средней интенсивности флуоресценции оценивались уровни экспрессии поверхностных рецепторов. Установлено, что в дооперационном периоде у больных РГП независимо от исхода заболевания на фоне снижения абсолютного количества общих лимфоцитов в крови повышается содержание Т-клеток. Т-лимфоциты больных РГП значительно интенсивнее по сравнению с клетками здоровых людей экспрессируют рецепторы CD28 и CD62L. В дооперационном периоде и в течение двух недель послеоперационного лечения при благоприятном исходе РГП выявляется повышенное количество CD62L⁺ Т-лимфоцитов по сравнению с показателями больных с неблагоприятным исходом заболевания. Другими особенностями фенотипического состава Т-лимфоцитов у больных с благоприятным исходом РГП является повышение Т-регуляторной активности, которое проявляется как в дооперационном периоде, так и в течение двух недель послеоперационного лечения. При благоприятном исходе РГП уже на 14 сутки лечения наблюдается повышение количества активированных цитотоксических Т-лимфоцитов, которое при неблагоприятном исходе наблюдается только на 21 сутки лечения. Предполагается, что Т-клеточная супрессия и активация цитотоксических Т-клеток являются факторами, определяющими снижение интенсивности воспалительных процессов при РГП и, тем самым, повышающими уровень благоприятного исхода заболевания. При неблагоприятном исходе заболевания послеоперационная терапия слабее или с запаздыванием

Адрес для переписки:

Кудрявцев Игорь Владимирович
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12,
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.
Тел.: 8 (812) 234-29-29.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Contacts:

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

Библиографическое описание:

Савченко А.А., Борисов А.Г., Черданцев Д.В., Первова О.В., Кудрявцев И.В., Беленюк В.Д. Особенности фенотипа Т-лимфоцитов в динамике послеоперационного периода у больных перитонитом в зависимости от исхода заболевания // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 1. С. 115–127. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-115-127

Citation:

Savchenko A.A., Borisov A.G., Cherdantsev D.V., Pervova O.V., Kudryavtsev I.V., Belenyuk V.D. Peculiarities of the phenotype of T-lymphocytes in the dynamics of the postoperating period in patients with peritonite depending on the outcome of disease // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 115–127. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-115-127

влияет на динамику исследуемых показателей, чем при благоприятном исходе. При благоприятном исходе РГП повышение содержания CD3⁺CD57⁺-клеток наблюдается уже со второй недели лечения и более выражено, тогда как при неблагоприятном исходе РГП увеличение уровня данных клеток наблюдается только на третьей неделе лечения. Однако уровень экспрессии CD57 на Т-лимфоцитах на всем протяжении обследования более выражен при неблагоприятном исходе РГП.

Ключевые слова: перитонит, исход заболевания, Т-лимфоциты, Т-регуляторные клетки, цитотоксические Т-лимфоциты, дооперационный период, послеоперационное лечение.

PECULIARITIES OF THE PHENOTYPE OF T-LYMPHOCYTES IN THE DYNAMICS OF THE POSTOPERATING PERIOD IN PATIENTS WITH PERITONITE DEPENDING ON THE OUTCOME OF DISEASE

Savchenko A.A.^{a,b}, Borisov A.G.^{a,c}, Cherdancev D.V.^c, Pervova O.V.^c, Kudryavcev I.V.^d

^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

Abstract. The aim of the study was to investigate the phenotype of blood T-lymphocytes in the dynamics of the postoperative period in patients with widespread purulent peritonitis (WPP) depending on the outcome of the disease. A total of 36 patients aged 30–65 with acute surgical diseases and abdominal injuries complicated by WPP years were examined. Blood sampling was performed before the operation (preoperative period), and also on the 7th, 14th and 21st day of the postoperative period. 40 relatively healthy people of the same age range were examined as a control. Study of the phenotype of blood T-lymphocytes was carried out by the method of 5-color flow cytometry using direct immunofluorescence of whole peripheral blood. Mean levels of fluorescence were used to evaluate the expression levels of surface receptors. It was established that in the preoperative period in patients with WPP regardless of the outcome of the disease against the background of a decrease in the absolute amount of total lymphocytes in the blood the content of T cells increases. The T-lymphocytes of patients with WPP are significantly more intense expressing the CD28 and CD62L receptors than the cells of healthy people. In the preoperative period and within two weeks of postoperative treatment with a favorable outcome of the WPP an increased amount of CD62L⁺T-lymphocytes is detected in comparison with the indices of patients with an unfavorable outcome of the disease. Other features of the phenotypic composition of T-lymphocytes in patients with a favorable outcome of WPP is an increase in T-regulatory activity which manifests itself both in the preoperative period and within two weeks of postoperative treatment. With a favorable outcome of WPP an increase in the number of activated cytotoxic T-lymphocytes is observed on the 14th day of treatment which with an unfavorable outcome is observed only on the 21st day of treatment. It is assumed that T-cell suppression and activation of cytotoxic T cells are the factors determining a decrease in the intensity of inflammatory processes in WPP and thereby increasing the level of the favorable outcome of the disease. In case of an unfavorable outcome of the disease, postoperative therapy has a weaker or delayed effect on the dynamics of the studied parameters than with a favorable outcome. With a favorable outcome of WPP an increase in the CD3⁺CD57⁺ cell count is observed already from the second week of treatment and is more pronounced whereas in the case of an adverse outcome of WPP an increase in the level of these cells is observed only at the third week of treatment. However, the level of expression of CD57 on T-lymphocytes is more pronounced throughout the course of the examination with an unfavorable outcome of WPP.

Key words: peritonitis, outcome of the disease, T-lymphocytes, T-regulatory cells, cytotoxic T-lymphocytes, preoperative period, postoperative treatment.

Введение

Распространенный гнойный перитонит (РГП) остается одной из нерешенных проблем современной абдоминальной хирургии. В подавляющем большинстве случаев РГП является осложнением ряда острых хирургических заболеваний или травм живота (острый аппендицит, перфоративная язва желудка и двенадцатиперстной кишки, острый гангренозный холецистит, панкреонекроз, перфорация полых органов, их повреждение при травме и др.) [4,

19, 27]. До настоящего времени летальность при этом грозном осложнении воспалительных заболеваний и травм органов брюшной полости удерживается на уровне 20–30%, достигая наиболее высоких цифр (50% и более) при развитии полиорганной недостаточности (ПОН) и септического шока (СШ), профилактика и купирование которых являются ключевыми в лечении перитонита [13, 14].

Доказано, что само течение инфекционного процесса в брюшной полости, характер и особенности развития гнойных послеоперацион-

ных осложнений определяются не только тяжестью основного заболевания, адекватностью выполненного оперативного вмешательства и полнотой проводимой интенсивной терапии, но и функциональным состоянием иммунной системы [1, 10, 30]. Установлено, что повышение функциональной активности В-лимфоцитов приводит к затруднению развития антигензависимого перитонита у мышей в эксперименте [25]. В работе Confer B.D. et al. (2013) показано, что частота спонтанного развития бактериальных перитонитов у больных циррозом печени была выше при сниженном количестве и функциональной активности CD4⁺-лимфоцитов [7]. С помощью кластерного анализа иммунологических показателей обнаружено, что у больных РГП наиболее часто выделяются иммунодефицитный (большинство показателей иммунограммы ниже нормы) и ареактивный (большинство показателей иммунограммы соответствуют норме) иммунотипы [1].

Системная иммунодепрессия нарастает параллельно с манифестацией клинических признаков РГП. У больных РГП уже в дооперационном периоде в периферической крови повышено содержание CD62L⁺-, HLA-DR⁺- и CD64⁺-нейтрофилов [5]. Высокий уровень содержания CD62L⁺-клеток сохраняется в течение 24 суток послеоперационного периода, тогда как количество HLA-DR⁺- и CD64⁺-нейтрофилов на 24 сутки послеоперационного периода снижается до уровня нормы. Обсуждается, что тяжелая дисфункция иммунной системы является не просто ранним и надежным признаком развивающейся ПОН, а во многом определяет ее возникновение и последующее прогрессирование [1, 2]. Однако состояние иммунной системы у больных РГП в динамике заболевания исследовано недостаточно, в том числе и в зависимости от исхода заболевания. Особенно актуально исследовать состояние Т-клеточного иммунитета, так как Т-лимфоциты вовлечены не только в эффекторные процессы при перитонитах, но и участвуют в регуляции воспаления, интенсивность которого во многом определяет эффективность лечения и исхода заболевания [6, 24].

Таким образом, целью исследования явилось изучение фенотипического состава Т-лимфоцитов крови в динамике послеоперационного периода у больных РГП в зависимости от исхода заболевания.

Материалы и методы

На базе Красноярского краевого гнойно-септического центра КГБУЗ Краевая клиническая больница обследовано 36 пациентов с острыми хирургическими заболеваниями и травмами

органов брюшной полости, осложнившимися РГП, в возрасте 30–65 лет. Из исследования были исключены пациенты, у которых причиной РГП являлись: острый деструктивный панкреатит (панкреонекроз), тотальный мезентериальный тромбоз, онкологические заболевания, туберкулез. Объем оперативного вмешательства и количество санаций определялись лечащим врачом в зависимости от состояния больного. Забор крови производили перед операцией (дооперационный период), а также на 7, 14 и 21 сутки послеоперационного периода. В качестве контроля обследовано 40 относительно здоровых людей аналогичного возрастного диапазона.

Исследование фенотипа Т-лимфоцитов крови проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови с моноклональными антителами (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) в следующих панелях: CD62L-FITC/CD127-PE/CD3-ECD/CD25-PC5/CD4-PC7 и CD57-FITC/CD28-PE/CD3-ECD/CD62L-PC5/CD45-PC7. Дополнительно по средней интенсивности флуоресценции (MFI — Mean Fluorescence Intensity) оценивались уровни экспрессии поверхностных рецепторов. Распределение антител по каналам флуоресценции проводили в соответствии с принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований [3]. Пробоподготовку осуществляли по стандартной методике [16]. Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США) центра коллективного пользования КНЦ СО РАН. В каждой пробе анализировали не менее 50 000 лимфоцитов.

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 2013 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей (Q1 и Q3). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни (Mann–Whitney U-test). Достоверность различий в динамике лечения определяли по критерию Вилкоксона (Wilcoxon matched pairs test).

Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

Результаты

У больных с благоприятным исходом РГП в дооперационном периоде обнаружено снижение абсолютного количества лимфоцитов в крови (табл. 1). На 7 и 14 сутки наблюдается повышение содержания лимфоцитов, которое к 21 суткам послеоперационного периода достигает контрольного диапазона. До операции и на всем протяжении послеоперационного периода у пациентов с благоприятным

исходом заболевания сохраняется повышенное относительное количество CD3⁺-клеток. При этом процентный уровень CD3⁺CD4⁺- и CD3⁺CD62L⁺-лимфоцитов у пациентов данной группы повышен уже в дооперационном периоде, а к 21 суткам послеоперационного периода снижается как относительно контрольного диапазона, так и исходных значений. Относительное содержание CD3⁺CD8⁺-клеток в крови у больных с благоприятным исходом РГП относительно контрольного уровня и исходных значений повышается только на 21 сутки послеоперационного периода. К концу периода обследования при благоприятном исходе заболевания, как относительно контрольного

Таблица 1. Содержание CD3⁺-лимфоцитов в крови у больных с благоприятным исходом РГП в динамике лечения [Me (Q1 – Q3)]

Table 1. The number of CD3⁺-lymphocytes in blood in patients with favorable outcome of WPP in treatment dynamics [Me (Q1 – Q3)]

Показатели Parameters	Контроль Control n = 40	Больные РГП/WPP patients			
		Дооперационный период Preoperative period n = 21	7 сутки после операции 7 days after surgery n = 21	14 сутки после операции 14 days after surgery n = 21	21 сутки после операции 21 days after surgery n = 21
Лимфоциты, 10 ⁹ /л Lymphocyte, 10 ⁹ /l	2,05 (1,56–2,60)	1,06 (0,78–1,33) p ₁ < 0,001	1,32 (0,83–2,53) p ₁ = 0,007 p ₂ = 0,017	1,34 (0,90–2,08) p ₁ = 0,007	2,15 (1,35–3,89)
CD3 ⁺ , %	68,0 (62,5–74,0)	76,1 (71,7–82,0) p ₁ < 0,001	72,6 (67,2–81,5) p ₁ = 0,009	80,0 (70,0–82,6) p ₁ = 0,003	76,9 (69,9–89,9) p ₁ = 0,042
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , %	43,1 (35,0–48,0)	54,0 (45,7–60,5) p ₁ < 0,001	45,1 (37,7–51,6)	46,7 (39,8–50,6)	31,5 (28,5–37,5) p ₁ = 0,029 p ₂ = 0,008
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , %	27,0 (21,2–32,0)	21,2 (14,8–28,4)	22,2 (19,7–31,5)	37,2 (23,0–40,3)	41,0 (32,6–42,0) p ₁ = 0,045 p ₂ = 0,007
CD3 ⁺ CD25 ⁺ , %	4,9 (2,5–11,1)	7,4 (4,5–10,2)	5,5 (4,1–10,6)	6,3 (4,1–13,8)	4,9 (4,6–9,8)
CD3 ⁺ CD28 ⁺ , %	65,0 (56,1–71,4)	68,7 (62,4–75,9)	56,2 (48,4–72,0)	54,3 (49,3–69,1)	36,1 (32,1–38,2) p ₁ = 0,045 p _{2,3,4} < 0,008
CD3 ⁺ CD57 ⁺ , %	8,5 (4,8–12,3)	8,5 (4,5–16,1)	11,3 (8,2–18,8)	20,1 (11,3–22,6) p ₁ = 0,009 p ₂ = 0,048 p ₃ = 0,049	27,5 (20,8–29,2) p ₁ = 0,002 p ₂ = 0,027 p ₃ = 0,026
CD3 ⁺ CD62L ⁺ , %	42,2 (36,7–51,0)	51,2 (47,2–55,0) p ₁ = 0,034	48,9 (34,2–54,6)	46,7 (41,0–52,5)	32,5 (27,2–36,0) p ₁ = 0,008 p ₂ = 0,014

Примечание. p₁ — статистически значимые различия с показателями контрольной группы; p₂ — статистически значимые различия с показателями больных, находящихся в дооперационном периоде; p₃ — статистически значимые различия с показателями больных на 7 сутки после операции.

Note. p₁ — statistically significant differences versus controls; p₂ — statistically significant differences versus patients with WPP before surgery; p₃ — statistically significant differences versus 7 days after surgery patients.

уровня, так и исходных значений в крови у обследованных пациентов понижается относительное количество $CD3^+CD28^+$ -лимфоцитов. Процентное содержание $CD3^+CD57^+$ -клеток у больных с благоприятным исходом РГП повышается на 14 сутки обследования относительно контрольного уровня и значений, выявленных у данных лиц в дооперационном периоде и на 7 сутки послеоперационного периода.

Абсолютное содержание $CD3^+CD4^+$ -лимфоцитов у больных с благоприятным исходом РГП в дооперационном периоде в 1,3 раза ниже, чем у лиц контрольной группы (табл. 2), начиная с 7 суток после операции, их количество повышается до контрольных значений. Процентное содержание $CD3^+CD4^+CD62L^+$ -клеток у пациентов данной группы в дооперационном периоде и на 7 сутки обследования повышено относительно контрольного диапазона. На 14 сутки относительное количество

данной фракции Т-лимфоцитов остается повышенным относительно контрольных значений, но снижается по сравнению с исходным уровнем. На 21 сутки лечения у больных с благоприятным исходом РГП выявляется снижение количества $CD3^+CD4^+CD62L^+$ -лимфоцитов относительно контрольного и исходного уровней. Относительный уровень $CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}$ - и $CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}CD62L^+$ -клеток у больных с благоприятным исходом РГП в дооперационном периоде соответственно в 2,2 и 1,9 раз выше, чем у лиц контрольной группы. На 7 и 14 сутки лечения их количество остается повышенным, но на 21 сутки послеоперационного периода снижается до уровня контрольных значений. Абсолютное количество $CD3^+CD8^+$ -лимфоцитов у больных с благоприятным исходом РГП в дооперационном периоде понижено относительно контрольного уровня в 2,6 раза. На 7 сутки лечения их пониженное

Таблица 2. Содержание $CD4^+$ - и $CD8^+$ -лимфоцитов в крови у больных с благоприятным исходом РГП в динамике лечения [Ме (Q1 — Q3)]

Table 2. The number of $CD4^+$ - и $CD8^+$ -lymphocytes in blood in patients with favorable outcome of WPP in treatment dynamics [Me (Q1 — Q3)]

Показатели Parameters	Контроль Control n = 40	Больные РГП/WPP patients			
		Дооперационный период Preoperative period n = 21	7 сутки после операции 7 days after surgery n = 21	14 сутки после операции 14 days after surgery n = 21	21 сутки после операции 21 days after surgery n = 21
$CD3^+CD4^+$, $10^9/l$	0,83 (0,56–1,16)	0,62 (0,40–0,72) $p_1 = 0,002$	0,74 (0,35–1,15)	0,61 (0,42–0,98)	0,74 (0,50–1,08)
$CD3^+CD4^+CD62L^+$, %	29,4 (24,6–35,9)	53,3 (39,7–83,1) $p_1 < 0,001$	53,0 (36,2–78,1) $p_1 < 0,001$	38,1 (30,8–77,8) $p_1 = 0,036$ $p_2 = 0,010$ $p_3 = 0,008$	21,3 (18,7–27,9) $p_1 = 0,039$ $p_{2,3} < 0,001$
$CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}$, %	5,1 (4,0–6,6)	11,2 (7,4–15,5) $p_1 < 0,001$	9,4 (4,8–15,8) $p_1 = 0,001$	6,4 (5,0–17,1) $p_1 = 0,026$	3,2 (2,8–4,1) $p_{2,3} < 0,001$ $p_4 = 0,034$
$CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}CD62L^+$, %	3,8 (2,9–4,9)	7,3 (5,8–10,5) $p_1 < 0,001$	6,5 (4,1–8,7) $p_1 = 0,001$	5,7 (4,0–11,6) $p_1 = 0,027$	2,6 (2,3–3,4) $p_{2,3} < 0,001$ $p_4 = 0,025$
$CD3^+CD8^+$, $10^9/l$	0,55 (0,37–0,80)	0,21 (0,13–0,33) $p_1 = 0,013$	0,30 (0,21–0,35) $p_1 = 0,002$	0,43 (0,20–0,86)	0,90 (0,54–1,63) $p_1 = 0,025$ $p_{2,3} < 0,001$
$CD3^+CD8^+CD11b^+$, %	24,9 (20,2–29,7)	21,2 (14,8–28,3)	22,0 (19,7–31,4)	37,1 (22,6–40,2) $p_1 = 0,041$ $p_2 = 0,046$	40,7 (32,6–41,8) $p_1 = 0,018$ $p_2 = 0,007$ $p_3 = 0,010$

Примечание. p_1 — статистически значимые различия с показателями контрольной группы; p_2 — статистически значимые различия с показателями больных, находящихся в дооперационном периоде; p_3 — статистически значимые различия с показателями больных на 7 сутки после операции; p_4 — статистически значимые различия с показателями больных на 14 сутки после операции.

Note. p_1 — statistically significant differences versus controls; p_2 — statistically significant differences versus patients with WPP before surgery; p_3 — statistically significant differences versus 7 days after surgery patients; p_4 — statistically significant differences versus 14 days after surgery patients.

содержание сохраняется, но на 21 сутки лечения количество CD3⁺CD8⁺-клеток повышается как относительно контрольного уровня (в 1,6 раза), так и исходного (в 4,3 раза). Процентное содержание CD3⁺CD8⁺CD11b⁺-лимфоцитов при благоприятном исходе РГП в дооперационном периоде и на 7 сутки после операции соответствует контрольным значениям, но на 14 и 21 сутки лечения наблюдается значительное повышение их количества.

При исследовании уровней экспрессии активационных и адгезионных рецепторов на поверхности Т-лимфоцитов обнаружено, что у больных с благоприятным исходом РГП в дооперационном периоде уровень экспрессии CD28 на CD3⁺-клетках выше, чем у лиц контрольной группы, но уже с 7 суток лечения уровень экспрессии данного маркера снижается до контрольных значений (табл. 3). Уровень экспрессии CD57 на CD3⁺-лимфоцитах при благоприятном исходе РГП в дооперационном периоде и первые две недели послеоперационного периода соответствует контрольному диапазону, тогда как на 21 сутки лечения наблюдается значительное понижение уровня экспрессии данного маркера как относительно контрольных, так и исходных значений. Уровень

экспрессии CD62L на CD3⁺-клетках у больных данной группы повышен относительно контрольного уровня на все протяжении обследования. В то же время, уровень экспрессии CD62L на CD3⁺CD4⁺- и Treg-клетках в дооперационном периоде соответствует контрольным диапазонам, тогда как с 7 и по 21 сутки лечения уровень экспрессии данного маркера значительно превышает контрольные значения.

Абсолютное количество лимфоцитов в периферической крови у больных с неблагоприятным исходом РГП в дооперационном периоде и в первые две недели послеоперационного лечения понижено по сравнению с контрольным уровнем, на 21 сутки лечения их содержание восстанавливается (табл. 4). Относительное количество CD3⁺-лимфоцитов у больных данной группы повышено относительно контрольных значений только в дооперационном периоде. В то же время, процентное содержание CD3⁺CD4⁺- и CD3⁺CD28⁺-клеток в дооперационном периоде и начале послеоперационного лечения соответствует уровням, выявляемым у лиц контрольной группы, но на 21 сутки лечения понижается относительно контрольных значений и исходных уровней. Относительное количество CD3⁺CD57⁺-лимфоцитов при не-

Таблица 3. Уровни экспрессии некоторых CD-рецепторов на Т-лимфоцитах крови у больных с благоприятным исходом РГП в динамике лечения [Ме (Q1 — Q3)]

Table 3. Levels of some CD-receptors expression on blood T-lymphocytes in patients with favorable outcome of WPP in treatment dynamics [Me (Q1 — Q3)]

Показатели Parameters	Контроль Control n = 40	Больные РГП/WPP patients			
		Дооперационный период Preoperative period n = 21	7 сутки после операции 7 days after surgery n = 21	14 сутки после операции 14 days after surgery n = 21	21 сутки после операции 21 days after surgery n = 21
MFI CD28 на CD3⁺-клетках, о.е. MFI CD28 on CD3 ⁺ -cells, r.u.	12,00 (10,00–13,70)	16,40 (12,80–18,50) p ₁ < 0,001	14,00 (11,00–18,30) p ₂ = 0,028	13,45 (11,95–15,05)	13,65 (11,15–15,85)
MFI CD57 на CD3⁺-клетках, о.е. MFI CD57 on CD3 ⁺ -cells, r.u.	35,25 (24,10–47,90)	44,00 (20,70–63,60)	21,40 (12,30–66,70)	34,10 (15,90–41,70)	21,00 (8,27–33,65) p ₁ = 0,029 p ₂ = 0,038
MFI CD62L на CD3⁺-клетках, о.е. MFI CD62L on CD3 ⁺ -cells, r.u.	3,47 (2,91–4,44)	5,15 (3,18–6,52) p ₁ = 0,042	4,74 (4,01–6,31) p ₁ = 0,024	5,09 (4,64–6,63) p ₁ = 0,021	5,46 (4,64–6,62) p ₁ = 0,039
MFI CD62L на CD3⁺CD4⁺-клетках, о.е. MFI CD62L on CD3 ⁺ CD4 ⁺ -cells, r.u.	3,26 (2,61–4,46)	4,83 (3,64–6,08) p ₁ = 0,027	4,50 (3,79–5,92) p ₁ = 0,018	4,75 (3,97–6,20) p ₁ = 0,017	5,38 (4,95–6,51) p ₁ = 0,030
MFI CD62L на Treg, о.е. MFI CD62L on Tger, r.u.	3,21 (2,66–4,39)	4,28 (2,96–5,41)	4,50 (3,77–5,67) p ₁ = 0,008	4,61 (3,44–5,89) p ₁ = 0,029	4,96 (4,50–6,30) p ₁ = 0,032

Примечание. p₁ — статистически значимые различия с показателями контрольной группы; p₂ — статистически значимые различия с показателями больных, находящихся в дооперационном периоде.

Note. p₁ — statistically significant differences versus controls; p₂ — statistically significant differences versus patients with WPP before surgery.

благоприятном исходе РГП повышается относительно контрольного диапазона на 21 сутки послеоперационного периода, тогда как процентное содержание CD3⁺CD62L⁺-клеток в этот же период снижается.

При сравнении содержания CD3⁺-лимфоцитов, экспрессирующих активационные и адгезионные маркеры, у больных в зависимости от исхода РГП обнаружено, что при неблагоприятном исходе заболевания в крови на 14 и 21 сутки лечения понижено относительное количество CD3⁺CD57⁺-клеток ($p = 0,025$ и $p = 0,034$, соответственно). Также при неблагоприятном исходе РГП в периферической крови больных в дооперационном периоде и на всем протяжении послеоперационного периода снижено процентное содержание CD3⁺CD62L⁺-клеток: перед операцией — $p = 0,039$, на 7 суток лечения — $p = 0,045$, на 14 суток — $p = 0,044$ и на 21 сутки — $p = 0,040$.

При неблагоприятном исходе РГП в периферической крови обследованных пациентов в дооперационном периоде и по 14 сутки послеоперационного лечения снижается абсолютное количество CD3⁺CD4⁺- и CD3⁺CD8⁺-лимфоцитов, уровень которых на 21 сутки лечения повышается до контрольных значений (табл. 5). В конце периода обследования у данной категории больных относительно контрольных значений снижается процентное содержание CD3⁺CD4⁺CD127^{Low}CD25^{High}- и CD3⁺CD4⁺CD127^{Low}CD25^{High}CD62L⁺-клеток. Процентное содержание CD3⁺CD8⁺CD11b⁺-лимфоцитов в дооперационном периоде и на начальном периоде послеоперационного лечения у больных с неблагоприятным исходом РГП соответствует контрольному диапазону, но значительно повышается на 21 сутки обследования как относительно контрольных значений, так и исходного уровня.

Таблица 4. Содержание CD3⁺-лимфоцитов в крови у больных с неблагоприятным исходом РГП в динамике лечения [Ме (Q1 — Q3)]

Table 4. The number of CD3⁺-lymphocytes in blood in patients with adverse outcome of WPP in treatment dynamics [Ме (Q1 — Q3)]

Показатели Parameters	Контроль Control n = 40	Больные РГП/WPP patients			
		Дооперационный период Preoperative period n = 15	7 суток после операции 7 days after surgery n = 11	14 суток после операции 14 days after surgery n = 10	21 сутки после операции 21 days after surgery n = 7
Лимфоциты, 10 ⁹ /л Lymphocyte, 10 ⁹ /l	2,05 (1,56–2,60)	0,70 (0,37–1,25) $p_1 < 0,001$	0,87 (0,70–1,81) $p_1 < 0,001$	1,06 (0,65–1,11) $p_1 < 0,001$	2,06 (1,27–2,85) $p_2 = 0,009$ $p_3 = 0,032$
CD3 ⁺ , %	68,0 (62,5–74,0)	73,1 (67,0–88,3) $p_1 = 0,048$	70,7 (63,8–78,9)	75,4 (64,3–82,2)	75,9 (61,0–81,6)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , %	43,1 (35,0–48,0)	46,5 (42,5–52,4)	42,6 (33,0–50,2)	38,0 (19,2–51,2)	26,3 (25,7–37,5) $p_1 = 0,020$ $p_2 = 0,017$
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , %	27,0 (21,2–32,0)	23,5 (15,3–27,1)	19,2 (14,7–27,7)	19,6 (16,9–31,4)	33,9 (31,5–36,2)
CD3 ⁺ CD25 ⁺ , %	4,9 (2,5–11,1)	7,2 (2,4–9,8)	4,0 (2,0–10,4)	7,3 (2,5–11,6)	6,2 (3,4–9,9)
CD3 ⁺ CD28 ⁺ , %	65,0 (56,1–71,4)	66,9 (59,9–72,7)	64,6 (50,2–71,4)	60,1 (56,1–69,6)	50,1 (31,0–59,3) $p_1 = 0,031$ $p_2 = 0,040$
CD3 ⁺ CD57 ⁺ , %	8,5 (4,8–12,3)	10,6 (9,5–13,0)	7,8 (4,6–17,2)	7,4 (4,6–10,2)	13,5 (13,0–15,5) $p_1 = 0,014$
CD3 ⁺ CD62L ⁺ , %	42,2 (36,7–51,0)	38,0 (34,1–48,1)	35,5 (31,6–48,4)	40,0 (19,1–40,2)	27,0 (23,3–33,4) $p_1 = 0,008$

Примечание. p_1 — статистически значимые различия с показателями контрольной группы; p_2 — статистически значимые различия с показателями больных, находящихся в дооперационном периоде; p_3 — статистически значимые различия с показателями больных на 7 сутки после операции.

Note. p_1 — statistically significant differences versus controls; p_2 — statistically significant differences versus patients with WPP before surgery; p_3 — statistically significant differences versus 7 days after surgery patients.

При проведении сравнительного анализа содержания CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитов в крови у больных РГП в зависимости от исхода заболевания обнаружено, что при неблагоприятном исходе в периферической крови обследованных пациентов в дооперационном периоде и первые две недели послеоперационного лечения снижено абсолютное количество CD3⁺CD4⁺-клеток (до операции — $p = 0,047$, на 7 сутки лечения — $p = 0,029$ и на 14 сутки — $p = 0,045$). Также в дооперационном периоде и на 7 сутки после операции у пациентов при неблагоприятном исходе РГП понижено относительное содержание CD3⁺CD4⁺CD62L⁺-лимфоцитов (до операции — $p = 0,025$ и на 7 сутки лечения — $p = 0,046$). Только в дооперационном периоде у больных с неблагоприятным исходом РГП понижено процентное содержание CD3⁺CD4⁺CD127^{Low}CD25^{High}- и CD3⁺CD4⁺CD127^{Low}CD25^{High}CD62L⁺-клеток ($p = 0,039$ и $p = 0,025$ соответственно). Также, у данной категории пациентов на 14 и 21 сутки лечения повышен абсолютный уровень CD3⁺CD8⁺-лимфоцитов ($p = 0,025$ и $p = 0,048$ соответственно).

При исследовании уровней экспрессии активационных и адгезионных маркеров на Т-лимфоцитах у больных с неблагоприятным исходом РГП выявлено, что у данной группы пациентов на всем протяжении обследования относительно контрольных значений повышена экспрессия CD28 и CD62L на CD3⁺-лимфоцитах, а также CD62L на CD3⁺CD4⁺- и Трег-клетках (табл. 6). Кроме того, при неблагоприятном исходе РГП с 7 по 21 сутки послеоперационного лечения повышена экспрессия CD57-рецептора на CD3⁺-лимфоцитах, как относительно контрольных значений (указано в табл. 6), так и уровней, выявленных у пациентов с благоприятным исходом РГП (на 7 сутки — $p = 0,039$, на 14 сутки — $p = 0,047$, на 21 сутки — $p = 0,032$).

Обсуждение

Само развитие РГП определяет наличие нарушений в регуляторных и эффекторных механизмах местного и системного иммунитета [7, 30]. Кроме того, хирургическое вмешательство

Таблица 5. Содержание CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитов в крови у больных с неблагоприятным исходом РГП в динамике лечения [Ме (Q1 — Q3)]

Table 5. The number of CD4⁺- and CD8⁺-lymphocytes in blood in patients with adverse outcome of WPP in treatment dynamics [Me (Q1 — Q3)]

Показатели Parameters	Контроль Control n = 40	Больные РГП/WPP patients			
		Дооперационный период Preoperative period n = 15	7 сутки после операции 7 days after surgery n = 11	14 сутки после операции 14 days after surgery n = 10	21 сутки после операции 21 days after surgery n = 7
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,83 (0,56–1,16)	0,37 (0,19–0,59) $p_1 < 0,001$	0,34 (0,28–0,46) $p_1 < 0,001$	0,41 (0,13–0,55) $p_1 = 0,001$	0,61 (0,48–0,75) $p_3 = 0,040$
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD62L ⁺ , %	29,4 (24,6–35,9)	32,2 (29,8–46,6)	39,6 (20,6–52,9)	31,1 (28,6–59,9)	26,5 (19,8–68,0)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD127 ^{Low} CD25 ^{High} , %	5,1 (4,0–6,6)	4,4 (3,0–10,5)	6,3 (2,5–14,8)	6,4 (5,4–17,0)	2,6 (0,3–4,4) $p_1 = 0,034$ $p_4 = 0,006$
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD127 ^{Low} CD25 ^{High} CD62L ⁺ , %	3,8 (2,9–4,9)	3,4 (2,1–5,5)	3,5 (1,2–6,6)	4,8 (4,2–8,2)	2,3 (0,8–2,9) $p_1 = 0,045$ $p_4 < 0,001$
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,55 (0,37–0,80)	0,13 (0,08–0,19) $p_1 < 0,001$	0,23 (0,16–0,25) $p_1 < 0,001$	0,21 (0,19–0,34) $p_1 = 0,005$	0,68 (0,46–0,90) $p_{2,3,4} < 0,001$
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD11b ⁺ , %	24,9 (20,2–29,7)	23,5 (15,3–27,0)	19,1 (14,7–27,1)	19,3 (16,7–30,9)	33,5 (31,2–35,8) $p_1 = 0,032$ $p_{1,2} < 0,001$ $p_4 = 0,012$

Примечание. p_1 — статистически значимые различия с показателями контрольной группы; p_2 — статистически значимые различия с показателями больных, находящихся в дооперационном периоде; p_3 — статистически значимые различия с показателями больных на 7 сутки после операции; p_4 — статистически значимые различия с показателями больных на 14 сутки после операции.

Note. p_1 — statistically significant differences versus controls; p_2 — statistically significant differences versus patients with WPP before surgery; p_3 — statistically significant differences versus 7 days after surgery patients; p_4 — statistically significant differences versus 14 days after surgery patients.

и последующая антибактериальная терапия также вносят значительный вклад в нарушении иммунных механизмов [10]. Так, у обследованных пациентов с РГП независимо от исхода заболевания в дооперационном периоде выявляется снижение абсолютного количества лимфоцитов в крови, уровень которых восстанавливается до контрольных значений только на третьей недели лечения. В дооперационном периоде также независимо от исхода РГП наблюдается повышение содержания Т-лимфоцитов. Однако если при благоприятном исходе заболевания высокий уровень Т-лимфоцитов сохраняется весь период наблюдения (в течение 3 недель лечения), то при неблагоприятном исходе уже на 7 сутки послеоперационного лечения выявляется снижение количества Т-клеток до контрольного уровня.

При РГП меняется фенотипический состав Т-лимфоцитов и уровень экспрессии ими ряда маркеров. Так, только при благоприятном исходе РГП в дооперационном периоде наблюдается повышение количества Т-клеток, экспрессирующих CD62L-маркер. Однако независимо от исхода заболевания на 21 сутки лечения обнаружено снижение количества Т-лимфоцитов с экспрессией рецепторов CD62L и CD28. CD62L — мембранный гликопротеид семейства

L-селектинов, экспрессирующийся на различных клетках иммунной системы, обеспечивает межклеточные взаимодействия и хоминг Т-лимфоцитов в периферические лимфоидные органы [18, 22]. CD28 — гомодимер, относящийся к суперсемейству иммуноглобулинов, принимает участие в костимуляции Т-лимфоцитов [28, 31]. При этом необходимо отметить, что уровень экспрессии CD62L на Т-лимфоцитах больных РГП более выражен, чем у лиц контрольной группы, и не зависит от исхода заболевания. Исходно повышенный уровень экспрессии CD28 на Т-клетках больных с благоприятным исходом уже к 7 суткам лечения снижается до контрольного уровня, тогда как при неблагоприятном исходе заболевания остается повышенным в течение всего периода наблюдения.

К концу периода наблюдения у больных РГП в крови повышается содержание Т-лимфоцитов, экспрессирующих рецептор CD57. CD57 (также известный как HNK1 (human natural killer-1), L2, LEU7) представляет собой углеводный эпитоп, характеризующий накопление перфоринов и гранзимов, и экспрессируется на терминальной стадии дифференцировки клеток [11, 29]. У больных с благоприятным исходом заболевания повышение количества CD57⁺ Т-лимфоцитов проявляется на 2 неделе после-

Таблица 6. Уровни экспрессии некоторых CD-рецепторов на Т-лимфоцитах крови у больных с неблагоприятным исходом РГП в динамике лечения [Ме (Q1 — Q3)]

Table 6. Levels of some CD-receptors expression on blood T-lymphocytes in patients with adverse outcome of WPP in treatment dynamics [Me (Q1 — Q3)]

Показатели Parameters	Контроль Control n = 40	Больные РГП/WPP patients			
		Дооперационный период Preoperative period n = 15	7 сутки после операции 7 days after surgery n = 11	14 сутки после операции 14 days after surgery n = 10	21 сутки после операции 21 days after surgery n = 7
MFI CD28 на CD3⁺-клетках, о.е. MFI CD28 on CD3 ⁺ -cells, r.u.	12,00 (10,00–13,70)	15,70 (12,80–17,90) p ₁ = 0,003	14,45 (12,00–16,80) p ₁ = 0,045	19,85 (15,10–21,15) p ₁ = 0,031	14,15 (12,70–15,60) p ₁ = 0,043
MFI CD57 на CD3⁺-клетках, о.е. MFI CD57 on CD3 ⁺ -cells, r.u.	35,25 (24,10–47,90)	44,20 (28,30–51,50)	56,20 (30,10–98,80) p ₁ = 0,025	50,30 (38,90–59,10) p ₁ = 0,046	43,55 (42,70–44,40) p ₁ = 0,048
MFI CD62L на CD3⁺-клетках, о.е. MFI CD62L on CD3 ⁺ -cells, r.u.	3,47 (2,91–4,44)	6,75 (3,89–8,06) p ₁ = 0,042	5,17 (4,80–5,96) p ₁ = 0,010	6,96 (5,62–8,88) p ₁ = 0,015	5,66 (5,17–6,14) p ₁ = 0,038
MFI CD62L на CD3⁺CD4⁺-клетках, о.е. MFI CD62L on CD3 ⁺ CD4 ⁺ -cells, r.u.	3,26 (2,61–4,46)	6,08 (3,67–7,93) p ₁ = 0,014	5,17 (4,66–5,66) p ₁ = 0,012	6,60 (5,35–8,38) p ₁ = 0,019	5,30 (4,65–5,94) p ₁ = 0,018
MFI CD62L на Treg, о.е. MFI CD62L on Tger, r.u.	3,21 (2,66–4,39)	5,07 (3,56–5,44) p ₁ = 0,024	5,19 (4,31–5,65) p ₁ = 0,039	6,60 (5,25–7,33) p ₁ = 0,008	5,28 (4,62–5,94) p ₁ = 0,020

Примечание. p₁ — статистически значимые различия с показателями контрольной группы.

Note. p₁ — statistically significant differences versus controls.

операционного лечения, тогда как при неблагоприятном исходе РГП — на 3 неделе. В зависимости от исхода заболевания значительно различается уровень экспрессии данного маркера на Т-лимфоцитах. При благоприятном исходе в дооперационном периоде и в течение 2 недель лечения наблюдается соответствие контрольному уровню и только на 21 сутки послеоперационного периода уровень экспрессии CD57 на Т-лимфоцитах больных снижается. При неблагоприятном исходе РГП с 7 суток лечения и до конца наблюдаемого периода установлено повышение уровня экспрессии CD57 на Т-клетках. Причем CD57 является единственным из исследуемых рецепторов, уровень экспрессии которого зависит от исхода РГП. По-видимому, в крови больных с неблагоприятным исходом РГП с 7 суток послеоперационного лечения нарушается миграция в зону воспаления эффекторных фракций Т-лимфоцитов в терминальной стадии дифференцировки.

В целом, исходя из данного анализа, можно предположить, что на количество Т-лимфоцитов с экспрессией адгезионных и активационных рецепторов влияет как сам абдоминальный иммуновоспалительный процесс, так антибиотикотерапия, проводимая в послеоперационном периоде. Соответственно, снижение количества Т-клеток, экспрессирующих CD28 и CD62L, в крови больных РГП на 3 неделе лечения можно охарактеризовать как ингибированием реактивности клеток иммунной системы на фоне антибиотикотерапии, так и миграцией активированных клеток. Увеличение количества CD57⁺ Т-лимфоцитов в конце периода лечения РГП также можно определить влиянием антибиотикотерапии. В частности, ранее установлено, что при лечении антибиотиками больных неврологическими расстройствами в крови повышается количество CD57⁺-лимфоцитов [23].

При анализе фенотипического состава CD4⁺ Т-лимфоцитов в зависимости от исхода РГП установлено, что при благоприятном исходе заболевания у обследованных пациентов в дооперационном периоде наблюдается повышение относительного количества CD4⁺ Т-лимфоцитов, но при снижении их абсолютного содержания. На 7 и 14 сутки обследования содержание данной субпопуляции Т-лимфоцитов выравнивается относительно контрольного диапазона, на 21 сутки послеоперационного лечения выявляется понижение их процентного уровня. Изменение содержания в крови CD4⁺ Т-лимфоцитов при благоприятном исходе РГП с одной стороны определяется количеством лимфоцитов в динамике послеоперационного периода, с другой стороны — миграцией клеток из крови. Последнее подтверждается тем, что у данной группы пациентов в течение 2 недель

послеоперационного лечения наблюдается повышение количества CD4⁺ Т-клеток с экспрессией CD62L. Причем на всем протяжении обследования CD4⁺ Т-лимфоциты с большей активностью экспрессируют данный маркер, чем клетки данной фракции у здоровых людей.

При неблагоприятном исходе РГП в дооперационном периоде и первые две недели послеоперационного лечения наблюдается соответствие процентного количества CD4⁺ Т-клеток контрольному диапазону с понижением на 21 сутки. Абсолютное количество данной фракции клеток соответствует послеоперационной динамике абсолютного уровня общих лимфоцитов. Несмотря на повышенный уровень экспрессии рецептора CD62L, количество CD4⁺ Т-клеток с экспрессией CD62L у больных с неблагоприятным исходом не отличается от контрольного уровня на всем протяжении обследования. Отсутствие динамики в содержании CD4⁺CD62L⁺ Т-лимфоцитов при неблагоприятном исходе не позволяют предположить влияние механизмов миграции клеток на содержание Т-лимфоцитов-хелперов в крови.

В состав CD4⁺ Т-лимфоцитов входят Т-регуляторные клетки (Treg, CD3⁺CD4⁺CD127^{Low}CD25^{High}), которые осуществляют супрессию иммунного и воспалительного ответа [8, 15]. На модели перитонита доказано, что Treg способны мигрировать из крови в зону воспаления и осуществлять ингибирование воспалительных процессов [17]. Более того, в работе Schmoedel K. и соавт. (2015) показано, что при снижении функциональной активности Treg у мышей в модели перитонита, осложненного сепсисом, понижается уровень выживаемости животных [20]. Действительно, у больных с благоприятным исходом РГП наблюдается повышенное количество Treg в крови (в том числе, экспрессирующих CD62L-рецептор) в дооперационном периоде и первые две недели послеоперационного лечения. Только на 21 сутки наблюдения количество клеток снижалось до контрольных значений. При неблагоприятном исходе заболевания содержание Treg и CD62L⁺-Treg в дооперационном периоде и до 14 суток включительно соответствовала контрольному уровню, тогда как на 21 сутки понижалось ниже контрольного диапазона. Можно предположить, что понижение содержания в крови Treg, не экспрессирующих и экспрессирующих CD62L-рецептор, у больных РГП в конце наблюдаемого периода связано с проводимой антибиотикотерапией.

Известно, что функциональная активность цитотоксических Т-лимфоцитов во многом влияет на характер течения воспалительных процессов [12, 26]. У больных с благоприят-

ным исходом РГП относительное содержание цитотоксических Т-клеток в крови в дооперационном периоде и течение двух недель послеоперационного лечения соответствует контрольному диапазону и повышается только на 21 сутки лечения. При неблагоприятном исходе на всем протяжении обследования у пациентов выявляется соответствие процентного уровня CD8⁺-Т-клеток контрольному диапазону. Абсолютное содержание цитотоксических Т-лимфоцитов в крови у обследованных больных повторяет динамику количества общих лимфоцитов крови. Кроме того, установлено, что при благоприятном исходе заболевания у больных в крови, начиная с 14 суток лечения, повышается количество CD11b⁺ цитотоксических Т-клеток, тогда как при неблагоприятном исходе подобное повышение уровня клеток наблюдается только на 21 сутки послеоперационного лечения. Экспрессия CD11b (αМ цепь интегрин Мас-1) увеличивает миграционный и эффекторный потенциал цитотоксических Т-клеток [9, 21]. Накопление CD11b⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов в крови больных РГП в конце наблюдаемого периода характеризует нарушение миграционной активности цитотоксических клеток, что, по-видимому, определяется проводимым послеоперационным лечением.

Заключение

Таким образом, в дооперационном периоде у больных РГП независимо от исхода заболевания на фоне снижения абсолютного количества общих лимфоцитов в крови повышается содержание Т-клеток. Т-лимфоциты больных РГП значительно интенсивнее по сравнению с клетками здоровых людей экспрессируют рецепторы CD28 и CD62L. При этом, в дооперационном периоде и в течение двух недель послеоперационного лечения при благоприятном исходе РГП выявляется повышенное количество CD62L⁺ Т-лимфоцитов по сравнению

с показателями больных с неблагоприятным исходом заболевания. Другими особенностями фенотипического состава Т-лимфоцитов у больных с благоприятным исходом РГП является повышение Т-регуляторной активности (за счет увеличения количества неактивированных и активированных (по CD62L) Treg, которое проявляется как в дооперационном периоде, так и в течение двух недель послеоперационного лечения. При благоприятном исходе РГП уже на 14 сутки лечения наблюдается повышение количества активированных цитотоксических Т-лимфоцитов, которое при неблагоприятном исходе наблюдается только на 21 сутки лечения. По-видимому, Т-клеточная супрессия и активация цитотоксических Т-клеток являются факторами, определяющими снижение интенсивности воспалительных процессов при РГП и, тем самым, повышающими уровень благоприятного исхода заболевания. Установлено влияние послеоперационной антибиотикотерапии на состояние фенотипического состава Т-лимфоцитов при РГП. Причем, при неблагоприятном исходе заболевания послеоперационная терапия слабее или с запаздыванием влияет на динамику исследуемых показателей, чем при благоприятном исходе. При благоприятном исходе РГП повышение содержания CD3⁺CD57⁺-клеток наблюдается уже со второй недели лечения и более выражено, тогда как при неблагоприятном исходе РГП увеличение уровня данных клеток наблюдается только на третьей неделе лечения. Однако уровень экспрессии CD57 на Т-лимфоцитах на всем протяжении обследования более выражен при неблагоприятном исходе РГП. Установленные особенности динамики фенотипического состава Т-лимфоцитов у больных РГП в течение послеоперационного периода могут быть использованы для создания методов прогноза исхода заболевания и определяют необходимость разработки иммуноактивной терапии в послеоперационном периоде.

Список литературы/References

1. Борисов А.Г., Савченко А.А., Черданцев Д.В., Здзитовецкий Д.Э., Первова О.В., Кудрявцев И.В., Беленюк В.Д., Шапкина В.А. Типы иммунного реагирования при распространенном гнойном перитоните // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 2016. № 9. С. 28–34. [Borisov A.G., Savchenko A.A., Cherdantsev D.V., Zdzitovetsky D.E., Pervova O.V., Kudryavtsev I.V., Belenyuk V.D., Shapkina V.A. Types of immune response in advanced suppurative peritonitis. *Hirurgiya. Zhurnal im. N.I. Pirogova = Pirogov Russian Journal of Surgery*, 2016, no. 9, pp. 28–34. doi: 10.17116/hirurgia2016928-34 (In Russ.)]
2. Гаджиев Н.Д.О. Прогностическое значение интерлейкина-6 в различных биологических средах при распространенном перитоните // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. 2013. Т. 172, № 1. С. 25–29. [Gadzhiev N.J. Prognostic value of interleukin-6 in various biological environments in generalized peritonitis. *Vestnik khirurgii im. I.I. Grekova = Grekov's Bulletin of Surgery*, 2013, vol. 172, no. 1, pp. 25–29. (In Russ.)]
3. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шестицветного цитофлуориметрического анализа // Медицинская иммунология. 2015. Т. 17, № 1. С. 19–26. [Kudryavtsev I.V., Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, vol. 17, no. 1, pp. 19–26. doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-19-26 (In Russ.)]

4. Малков И.С., Филиппов В.А., Коробков В.Н., Тагиров М.Р. Распространенный перитонит: эволюция методов хирургического лечения // Практическая медицина. 2017. № 6 (107). С. 46–49. [Malkov I.S., Filippov V.A., Korobkov V.N., Tagirov M.R. Generalized peritonitis: evolution of surgical treatment methods. *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*, 2017, no. 6 (107), pp. 46–49. (In Russ.)]
5. Савченко А.А., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Гвоздев И.И., Мошев А.В., Черданцев Д.В., Первова О.В. Взаимосвязь фенотипа и метаболизма нейтрофилов крови у больных распространенным гнойным перитонитом в динамике послеоперационного периода // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 3. С. 259–270. [Savchenko A.A., Borisov A.G., Kudryavtsev I.V., Gvozdev I.I., Moshev A.V., Cherdancev D.V., Pervova O.V. The phenotype and metabolism relationship of blood neutrophils in patients with widespread purulent peritonitis in the postoperative period dynamics. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, vol. 7, no. 3, pp. 259–270. doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-259-270. (In Russ.)]
6. Bektas A., Schurman S.H., Sen R., Ferrucci L. Human T cell immunosenescence and inflammation in aging. *J. Leukoc. Biol.*, 2017, vol. 102, no. 4, pp. 977–988. doi: 10.1189/jlb.3RI0716-335R
7. Confer B.D., Lopez R., Zein N.N. CD4+ T-cell function and the risk for developing spontaneous bacterial peritonitis in patients with cirrhosis. *J. Clin. Gastroenterol.*, 2013, vol. 47, no. 9, pp. 807–813. doi: 10.1097/MCG.0b013e3182854969
8. Dey I., Bishayi B. Role of Th17 and Treg cells in septic arthritis and the impact of the Th17/Treg -derived cytokines in the pathogenesis of *S. aureus* induced septic arthritis in mice. *Microb. Pathog.*, 2017, vol. 113, pp. 248–264. doi: 10.1016/j.micpath.2017.10.033
9. Do J., Visperas A., Freeman M.L., Jang E., Kim S., Malissen B., Min B. $\gamma\delta$ T cells support gut Ag-reactive colitogenic effector T-cell generation by enhancing Ag presentation by CD11b(+) DCs in the mesenteric LN. *Eur. J. Immunol.*, 2016, vol. 46, no. 2, pp. 340–246. doi: 10.1002/eji.201545919
10. Fiore M., Maraolo A.E., Gentile I., Borgia G., Leone S., Sansone P., Passavanti M.B., Aurilio C., Pace M.C. Current concepts and future strategies in the antimicrobial therapy of emerging Gram-positive spontaneous bacterial peritonitis. *World J. Hepatol.*, 2017, vol. 9, no. 30, pp. 1166–1175. doi: 10.4254/wjh.v9.i30.1166
11. Gonzalez-Serna A., Ferrando-Martinez S., Tarancon-Diez L., De Pablo-Bernal R.S., Dominguez-Molina B., Jiménez J.L., Muñoz-Fernández M.Á., Leal M., Ruiz-Mateos E. Increased CD127+ and decreased CD57+ T cell expression levels in HIV-infected patients on NRTI-sparing regimens. *J. Transl. Med.*, 2017, vol. 15, no. 1, pp. 259. doi: 10.1186/s12967-017-1367-5
12. Gregersen S., Holm A.M., Fevang B., Ueland T., Sikkeland L.I., Aaløkken T.M., Mynarek G., Kongerud J., Aukrust P., Johansen B., Frøland S.S. Lung disease, T-cells and inflammation in common variable immunodeficiency disorders. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 2013, vol. 73, no. 6, pp. 514–522. doi: 10.3109/00365513.2013.819523
13. Kim J.W., Park J.H., Kim D.J., Choi W.H., Cheong J.C., Kim J.Y. The delta neutrophil index is a prognostic factor for post-operative mortality in patients with sepsis caused by peritonitis. *PLoS One*, 2017, vol. 12, no. 8: e0182325. doi: 10.1371/journal.pone.0182325
14. Launey Y., Duteurtre B., Larinet R., Nessler N., Tawa A., Mallédant Y., Seguin P. Risk factors for mortality in postoperative peritonitis in critically ill patients. *World J. Crit. Care Med.*, 2017, vol. 6, no. 1, pp. 48–55. doi: 10.5492/wjccm.v6.i1.48
15. Long A.E., Tatum M., Mikacenic C., Buckner J.H. A novel and rapid method to quantify Treg mediated suppression of CD4 T cells. *J. Immunol. Methods*, 2017, vol. 449, pp. 15–22. doi: 10.1016/j.jim.2017.06.009
16. 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
17. Maganto-García E., Bu D.X., Tarrío M.L., Alcaide P., Newton G., Griffin G.K., Croce K.J., Luscinskas F.W., Lichtman A.H., Gracie N. Foxp3+ inducible regulatory T cells suppress endothelial activation and leukocyte recruitment. *J. Immunol.*, 2011, vol. 187, no. 7, pp. 3521–3529. doi: 10.4049/jimmunol.1003947
18. Mahnke K., Useliene J., Ring S., Kage P., Jendrossek V., Robson S.C., Bylaite-Bucinskiene M., Steinbrink K., Enk A.H. Down-regulation of CD62L shedding in T cells by CD39(+) regulatory T cells leads to defective sensitization in contact hypersensitivity reactions. *J. Invest. Dermatol.*, 2017, vol. 137, no. 1, pp. 106–114. doi: 10.1016/j.jid.2016.08.023
19. Ruiz-Tovar J., Alonso N., Ochagavía A., Arroyo A., Llavero C. Effect of the abdominal fascial closure with triclosan-coated sutures in fecal peritonitis, on surgical site infection, and evisceration: a retrospective multi-center study. *Surg. Infect. (Larchmt)*, 2018, vol. 19, no. 1, pp. 61–64. doi: 10.1089/sur.2017.171
20. Schmoedel K., Traffehn S., Eger C., Pötschke C., Bröker B.M. Full activation of CD4+ T cells early during sepsis requires specific antigen. *Shock*, 2015, vol. 43, no. 2, pp. 192–200. doi: 10.1097/SHK.0000000000000267
21. Shiokawa A., Kotaki R., Takano T., Nakajima-Adachi H., Hachimura S. Mesenteric lymph node CD11b(–) CD103(+) PD-L1(High) dendritic cells highly induce regulatory T cells. *Immunology*, 2017, vol. 152, no. 1, pp. 52–64. doi: 10.1111/imm.12747
22. Sopper S., Mustjoki S., White D., Hughes T., Valent P., Burchert A., Gjertsen B.T., Gastl G., Baldauf M., Trajanoski Z., Giles F., Hochhaus A., Ernst T., Schenk T., Janssen J.J., Ossenkoppele G.J., Porkka K., Wolf D. Reduced CD62L expression on T cells and increased soluble CD62L levels predict molecular response to tyrosine kinase inhibitor therapy in early chronic-phase chronic myelogenous leukemia. *J. Clin. Oncol.*, 2017, vol. 35, no. 2, pp. 175–184. doi: 10.1200/JCO.2016.67.0893
23. Stricker R.B., Winger E.E. Musical hallucinations in patients with Lyme disease. *South Med. J.*, 2003, vol. 96, no. 7, pp. 711–715.
24. Sugita S., Shimizu J., Makabe K., Keino H., Watanabe T., Takahashi M. Inhibition of T cell-mediated inflammation in uveitis by a novel anti-CD3 antibody. *Arthritis Res. Ther.*, 2017, vol. 19, no. 1, pp. 176. doi: 10.1186/s13075-017-1379-9
25. Tomasdottir V., Thorleifsdottir S., Vikingsson A., Hardardottir I., Freysdottir J. Dietary omega-3 fatty acids enhance the B1 but not the B2 cell immune response in mice with antigen-induced peritonitis. *J. Nutr. Biochem.*, 2014, vol. 25, no. 2, pp. 111–117. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.09.010
26. Tosi M.F., van Heeckeren A., Ferkol T.W., Askew D., Harding C.V., Kaplan J.M. Effect of *Pseudomonas*-induced chronic lung inflammation on specific cytotoxic T-cell responses to adenoviral vectors in mice. *Gene Ther.*, 2004, vol. 11, no. 19, pp. 1427–1433. doi: 10.1038/sj.gt.3302290
27. Umemura A., Ishida K., Nitta H., Takahara T., Hasegawa Y., Makabe K., Sasaki A. A Rare Case of intraductal tubulopapillary neoplasm of the pancreas rupturing and causing acute peritonitis. *Case Rep. Gastroenterol.*, 2017, vol. 11, no. 3, pp. 661–666. doi: 10.1159/000481935

28. Velasquez M.P., Szoor A., Vaidya A., Thakkar A., Nguyen P., Wu M.F., Liu H., Gottschalk S. CD28 and 41BB costimulation enhances the effector function of CD19-specific engager T cells. *Cancer Immunol. Res.*, 2017, vol. 5, no. 10, pp. 860–870. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0171
29. Verma K., Ogonek J., Varanasi P.R., Luther S., Bünting I., Thomay K., Behrens Y.L., Mischak-Weissinger E., Hambach L. Human CD8⁺CD57⁻ TEMRA cells: too young to be called «old». *PLoS One*, 2017, vol. 12, no. 5: e0177405. doi: 10.1371/journal.pone.0177405
30. Wang W., Shi Q., Dou S., Li G., Shi X., Jiang X., Wang Z., Yu D., Chen G., Wang R., Xiao H., Hou C., Feng J., Shen B., Ma Y., Han G. Negative regulation of Nod-like receptor protein 3 inflammasome activation by T cell Ig mucin-3 protects against peritonitis. *Immunology*, 2018, vol. 153, no. 1, pp. 71–83. doi: 10.1111/imm.12812
31. Zumerle S., Molon B., Viola A. Membrane rafts in T cell activation: a spotlight on CD28 costimulation. *Front. Immunol.*, 2017, vol. 8, pp. 1467. doi: 10.3389/fimmu.2017.01467

Авторы:

Савченко А.А., д.м.н., профессор, руководитель лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия; зав. кафедрой физиологии ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия;

Борисов А.Г., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия; доцент кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия;

Черданцев Д.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой и клиникой хирургических болезней им. проф. А.М. Дыхно с курсом эндоскопии и эндохирургии ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия;

Первова О.В., д.м.н., профессор кафедры и клиники хирургических болезней им. проф. А.М. Дыхно с курсом эндоскопии и эндохирургии ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия;

Кудрявцев И.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории общей иммунологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Беленюк В.Д., младший научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия.

Authors:

Savchenko A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Laboratory of Molecular Cell Physiology and Pathology, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation; Head of the Department of Physiology, Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F. Voyno-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. Voyno-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. Voyno-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. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; Associate Professor, Department of Immunology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Belenyuk V.D., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Cell Physiology and Pathology, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation.

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО СТАТУСА У БОЛЬНЫХ С РАЗНЫМИ КЛИНИЧЕСКИМИ ФОРМАМИ КРАСНОГО ПЛОСКОГО ЛИШАЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ РТА

С.В. Чуйкин¹, Г.М. Акмалова¹, И.А. Мирсаяпова², Г.И. Ронь³, Н.Д. Чернышева³,
Р.М. Хайруллина²

¹ ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Уфа, Россия

² ГБУЗ Республиканская детская клиническая больница, г. Уфа, Россия

³ ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Поражения слизистой оболочки рта занимают одно из ведущих мест в структуре стоматологических заболеваний. Наиболее актуальным среди дерматозов слизистой оболочки рта и красной каймы губ является красный плоский лишай, который рассматривают как мультифакторное заболевание. В литературе обсуждаются различные концепции патогенеза красного плоского лишая — это иммуноаллергическая, вирусная, наследственная и мембранодеструктивная. Многие авторы указывают на ведущую роль иммунной системы в развитии заболевания. Несмотря на свидетельство включения иммунных механизмов, сложности взаимоотношения патологического процесса и нормальных защитных реакций и возросший интерес к этому заболеванию, многие аспекты иммунологического конфликта при красном плоском лишае остаются неясными. Мало данных о конкретных изменениях в иммунной системе в зависимости от клинической формы заболевания, что определило цель настоящего исследования: определение иммунологического статуса у больных с различными клиническими формами красного плоского лишая слизистой оболочки рта. Обследована периферическая кровь у 286 пациентов (248 лиц женского пола и 38 мужского) в возрасте от 27 до 84 лет с красным плоским лишаем слизистой оболочки рта. Все пациенты были разделены на 6 групп в зависимости от клинической формы заболевания. Для оценки иммунологического статуса у больных с различными клиническими формами красного плоского лишая слизистой оболочки рта: типичной, экссудативно-гиперемической, эрозивно-язвенной, гиперкератотической, атипичной, буллезной были использованы методы для определения неспецифических механизмов защиты, гуморального и клеточного звеньев иммунитета. Проведенными иммунологическими исследованиями установлен комплекс иммунопатологических реакций, характеризующихся подавлением поглотительной и метаболической активности фагоцитов, дисиммуноглобулинемией, изменениями соотношений основных популяций и субпопуляций иммунокомпетентных клеток. Высокий уровень Т-хелперов — индукторов (CD4⁺) у больных с типичной, гиперкератотической, экссудативно-гиперемической, атипичной и эрозивно-язвенной формами заболевания характеризуется как самоподдерживающийся иммунный ответ, обусловленный подавлением элиминации патогенных агентов и, как следствие, приводящий к формированию аутоиммунного процесса. При оценке иммунного статуса

Адрес для переписки:

Акмалова Гюзель Маратовна
450000, Россия, г. Уфа, ул. Ленина, 3,
Башкирский государственный медицинский университет.
Тел.: 8 (917) 444-20-87 (моб.).
E-mail: akmalova-ekb@yandex.ru

Contacts:

Gyuzel M. Akmalova
450000, Russian Federation, Ufa, Lenina str., 3,
Bashkir State Medical University.
Phone: +7 (917) 444-20-87 (mobile).
E-mail: akmalova-ekb@yandex.ru

Библиографическое описание:

Чуйкин С.В., Акмалова Г.М., Мирсаяпова И.А., Ронь Г.И.,
Чернышева Н.Д., Хайруллина Р.М. Особенности иммунного статуса
у больных с разными клиническими формами красного плоского лишая
слизистой оболочки рта // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 1.
С. 128–134. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-128-134

Citation:

Chuykin S.V., Akmalova G.M., Mirsayapova I.A., Ron G.I., Chernysheva N.D.,
Khairullina R.M. Features of immune status in patients with various clinical
forms of oral lichen planus // Russian Journal of Infection and Immunity =
Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 1, pp.128–134. doi: 10.15789/2220-
7619-2019-1-128-134

у больных красным плоским лишаем слизистой оболочки рта установлена взаимосвязь между проявлениями синдрома «дисфагоцитоза», нарушениями в системе гуморального и клеточного звеньев иммунитета с различными клиническими формами заболевания, что позволяет сделать заключение о патогенетической роли дисбаланса в системе механизмов, обеспечивающих элиминацию патогенов, в том числе инфекционной природы в развитии заболевания.

Ключевые слова: красный плоский лишай, слизистая оболочка рта, дерматоз, патогенез, иммунный статус, иммуноглобулины.

FEATURES OF IMMUNE STATUS IN PATIENTS WITH VARIOUS CLINICAL FORMS OF ORAL LICHEN PLANUS

Chuykin S.V.^a, Akmalova G.M.^a, Mirsayapova I.A.^b, Ron G.I.^c, Chernysheva N.D.^c, Khairullina R.M.^b

^a Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation

^b Republican Children's Clinical Hospital, Ufa, Russian Federation

^c Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

Abstract. Oral mucosal lesions hold one of the lead places in the structure of dental diseases. Oral lichen planus (OLP) considered as a multifactorial disease is of top priority among dermatoses of oral mucosa and red lip border. Diverse putative concepts behind developing lichen planus pathogenesis are discussed including immunoallergic, viral, genetic and membrane-destructive theories. However, an immune theory is thought to play a crucial role in developing lichen planus. Despite documented induction of immune mechanisms, complex interaction between pathological process and normal defense response as well as stirred interest to it, multiple aspects of immunological conflict in lichen planus remain unclear. Few data describing altered immune parameters depending on clinical picture of lichen planus are currently available that suggested to perform the study aimed at examining immune status in patients with various forms of oral lichen planus. There were enrolled 286 oral lichen planus patients (248 females and 38 males), aged 27–84 years. Based on clinical picture, all OLP patients were divided into 6 groups: a typical type, exudative-congestive, erosive-ulcerous, hyperkeratotic, atypical, bullous type. An immune status in peripheral blood samples was evaluated by analyzing innate defense mechanisms as well as humoral and cellular immunity. Multiple altered immune parameters characterized by impaired phagocytic capture and metabolic activity, disimmunoglobulinemia, altered ratio of major immunocompetent cell types and subsets were documented during the study. Moreover, OLP patients with typical, hyperkeratotic, exudative hyperemic, atypical and erosive ulcerous forms were found to have increased amount of CD4⁺ helper T cells associated with a self-sustained immune response due to suppressed elimination of pathogenic agents consequently resulting in developing autoimmune process. While analyzing immune status in OLP patients, it allowed to find a relationship between dysphagocytosis signs, impaired humoral and cellular immunity as well as various clinical forms of the disease. Thus, it suggests imbalanced mechanisms responsible for pathogen elimination might play a role in OLP pathogenesis, including infectious agents being involved in its development.

Key words: lichen planus, oral mucosa, dermatosis, pathogenesis, immune status, immunoglobulins.

Поражения слизистой оболочки рта занимают одно из ведущих мест в структуре стоматологических заболеваний. Наиболее актуальным среди дерматозов слизистой оболочки рта (СОР) и красной каймы губ является красный плоский лишай (КПЛ) [3, 4]. Согласно классификации, предложенной Е.В. Боровским и А.Л. Машкил-лейсоном, выделены следующие клинические формы КПЛ СОР: типичная, экссудативно-гиперемическая, эрозивно-язвенная, гиперкератотическая, атипичная, буллезная.

Несмотря на многообразие исследований, проводимых у нас в стране и за рубежом, этиология и патогенез КПЛ остаются предметом многочисленных дискуссий. Данный вид дерматоза рассматривают как мультифакторное заболевание [7, 8, 10]. В литературе обсуждаются различные концепции патогенеза КПЛ, среди которых ведущими являются иммуноаллерги-

ческая, вирусная, наследственная и мембрано-деструктивная [2, 3, 5, 9]. Кроме того, представлены также отечественные работы по изучению генетических факторов в механизме развития КПЛ слизистой оболочки рта [1]. Ряд исследователей считает, что в основе патогенеза КПЛ СОР лежат антигенспецифические механизмы, не исключаются при этом и неспецифические механизмы. В развитии тяжелых форм КПЛ СОР придается значение лекарственным средствам, физическим и химическим факторам, а также сопутствующим вирусным, аутоиммунным и онкологическим заболеваниям [8, 10, 11].

Многие авторы указывают на ведущую роль иммунной системы в развитии заболевания [6, 11, 12]. Клетками, участвующими в патогенезе красного плоского лишая, являются: кератиноциты, дендритные клетки, макрофаги и лаброциты, CD8⁺ Т-лимфоциты (супрессоры), CD4⁺

Т-лимфоциты (хелперы), уровень которых варьирует в зависимости от стадии заболевания. На ранних стадиях красного плоского лишая, уровень лимфоцитов Т-хелперов, макрофагов и дендритных клеток выше, чем уровень клеток на более поздних стадиях поражения, которые характеризуются высоким уровнем Т-супрессоров-лимфоцитов. Это распределение показывает, что на ранних стадиях преобладают антиген-представляющие клетки, а также те клетки, которые ответственны за активацию воспалительного процесса. При красном плоском лишае клеткой-мишенью являются кератиноциты, которые подвергаются апоптозу, однако, чтобы это произошло, эти клетки должны выделить антиген — до сих пор неизвестный. После активации кератиноциты выделяют хемокины, притягивающие лимфоциты и другие клетки иммунной системы, которые могут вызвать развитие красного плоского лишая, а также способствовать развитию хронического течения заболевания. Дендритные клетки играют важную роль в иммунологической реакции, так как они активируют Т-клетки через антигенную стимуляцию. Исследования показали, что при красном плоском лишае увеличивается количество дендритных клеток, что указывает на их связь с патогенезом заболевания. Среди дендритных клеток наиболее изучены клетки Лангерганса. Эти клетки находятся над базальным слоем многослойного эпителия кожи и слизистой оболочки рта, функция которого заключается в захвате антигенов. При их активации они мигрируют в регионарные лимфоузлы, где происходит представление Т-лимфоцитам антигенов, запускающее первичный иммунный ответ. Есть предположение, что при этом заболевании клетки Лангерганса играют важную роль в представлении антигенов Т-лимфоцитам через II класс молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС), обеспечивая не только первичный иммунный ответ, но и последующий вторичный, который способствует появлению клинических признаков болезни.

CD4⁺ Т-лимфоциты являются клетками, способными к активации В-лимфоцитов, макрофагов и Т-лимфоцитов CD8⁺, они являются ответственными за организацию различных клеток в иммунной реакции. По мнению некоторых авторов, красный плоский лишай относится к аутоиммунным процессам вследствие преобладания Th1-клеток (воспалительных Т-хелперов CD4⁺), способствующих развитию воспалительной реакции гиперчувствительности замедленного типа.

Несмотря на свидетельство включения иммунных механизмов, сложность взаимоотношений патологического процесса и нормальных защитных реакций, и возросший интерес

к этому заболеванию, многие аспекты иммунологического конфликта при КПЛ остаются неясными. Мало данных о конкретных изменениях в иммунной системе в зависимости от клинической формы заболевания, что определило цель настоящего исследования: иммунологического статуса у больных с различными клиническими формами КПЛ СОР.

Было проведено клиническое, лабораторное обследование 286 пациентов (248 лиц женского пола и 38 мужского) в возрасте от 27 до 84 лет с красным плоским лишаем слизистой оболочки рта, которые были разделены на 6 групп в зависимости от клинической формы заболевания. 1 группу составил 71 пациент с типичной формой КПЛ СОР, 2 группу — 67 пациентов с эксудативно-гиперемической формой, 3 группу — 75 человек с эрозивно-язвенной формой, 4 группу — 27 пациентов с гиперкератотической формой КПЛ СОР, 5 группу — 39 человек с атипичной формой, 6 группу — 7 пациентов с буллезной формой КПЛ СОР. В контрольную группу были включены 30 женщин в возрасте от 44 до 70 лет без красного плоского лишая слизистой оболочки рта.

Взятие крови проводили из локтевой вены натощак.

Неспецифическое звено иммунитета характеризовалось определением фагоцитарной активности нейтрофилов с использованием метода с латексными частицами.

Гуморальная система иммунитета оценивалась по содержанию иммуноглобулинов классов А, М, G в сыворотке крови, методом радиальной иммунодиффузии в геле по Манчини с использованием моноспецифических антисывороток и по определению уровня циркулирующих иммунных комплексов (мол. масса — 6000) осаждением полиэтиленгликолем.

Для определения популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов проводили иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови с использованием моноклональных антител фирмы Becton Dickinson, методом проточной цитометрии (BD FACS Conton).

Статистическая обработка данных выполнялась с помощью методов медико-биологической статистики.

Для исследования влияния нескольких факторных признаков на количественный зависимый признак в работе использовался параметрический дисперсионный анализ. Параметрический дисперсионный анализ основан на разложении общей дисперсии зависимого показателя на две составляющие — объясненную дисперсию (то есть дисперсию, объясненную вариацией факторных показателей) и остаточную дисперсию (то есть дисперсию,

не объясненную вариацией факторных показателей). Затем объясненная дисперсия может быть в свою очередь разложена на составляющие, вызванные влиянием каждого фактора в отдельности, а также их сочетанным действием. Сила влияния фактора, обозначаемая символом η^2 , отражает долю (%) изменчивости результативного признака, которую можно объяснить действием одного фактора или сочетанием действия нескольких факторов. Для оценки значимости влияния факторов на результативный показатель использовался критерий Фишера.

Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ средних показателей фагоцитарной активности (ФА) у больных с разными формами КПЛ статистически значимо отличался ($\eta^2 = 71\%$, $F = 127$, $p < 0,0001$) (рис. 1). В контрольной группе все индивидуальные значения ФА варьировали в пределах 45–70%, то есть не выходили за границы нормальной вариации (40–80%). При КПЛ СОР средние уровни ФА находились в пределах от $32 \pm 5,8\%$ при «типичной» форме, до $25,5 \pm 5,9\%$ при «буллезной» форме. При типичной форме средний уровень ФА оказался статистически значимо выше, чем при других формах КПЛ, при этом, средние уровни ФА в этих группах были достаточно близки. В целом по всем шести формам КПЛ СОР средний уровень ФА составил $31,6 \pm 10,8\%$ и был снижен практически вдвое по сравнению с контрольной группой. Индивидуальные значения ФА в подавляющем числе случаев также оказались ниже границы нормы.

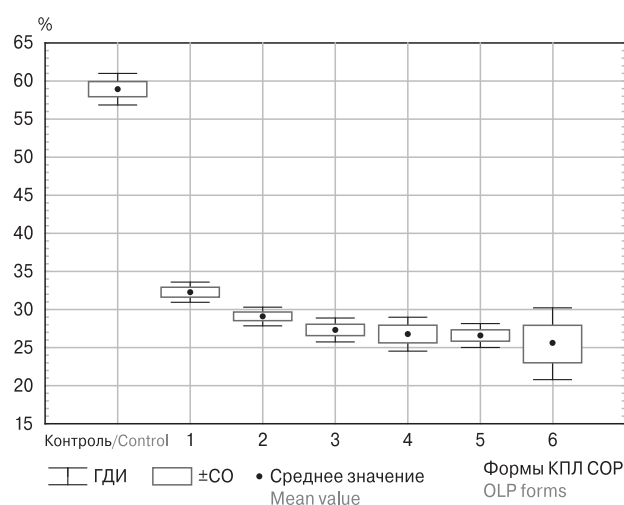


Рисунок 1. Уровень общей фагоцитарной активности (ФА) у больных разными формами КПЛ СОР

Figure 1. Total phagocytic activity (PA) in patients with various OLP forms

Аналогичная ситуация имела место при определении фагоцитарного числа (ФЧ). Этот показатель у больных был значительно и достоверно снижен по отношению к группе контроля ($\eta^2 = 83\%$, $F = 254$, $p < 0,0001$), в то время как его колебания при различных формах КПЛ СОР были гораздо менее выраженными (рис. 2).

Полученные данные позволяют судить о существенном снижении фагоцитарной активности клеток у пациентов при развитии КПЛ СОР, причем при разных его формах различия фагоцитарной активности выражены гораздо менее заметно, чем в целом в сравнении с таковыми в нормативной группе.

При определении гуморального звена иммунитета уровень сывороточного IgA у больных статистически значимо ($\eta^2 = 73\%$, $F = 142$, $p < 0,0001$) зависел от формы КПЛ СОР, но во всех случаях был выше, чем в контрольной группе (рис. 3).

При типичной форме КПЛ СОР содержание IgA в сыворотке составляло $2,30 \pm 0,8$ г/л, а его индивидуальные значения в 42% случаев были выше максимального значения в контрольной группе, хотя и не выходили за верхнюю границу нормы. Почти совпадал ($p > 0,53$) с ним средний уровень сывороточного IgA у больных с гиперкератотической формой КПЛ СОР ($2,40 \pm 1,08$ г/л; границы варьирования 0,99–4,78 г/л). Наивысший уровень IgA был отмечен у больных с экссудативно-гиперемической формой КПЛ — $4,26 \pm 0,80$ г/л, причем в 100% случаев результаты были выше верхней границы данного показателя в контрольной группе. Сходная ситуация имела место у больных с атипичной формой КПЛ СОР, где средний уро-

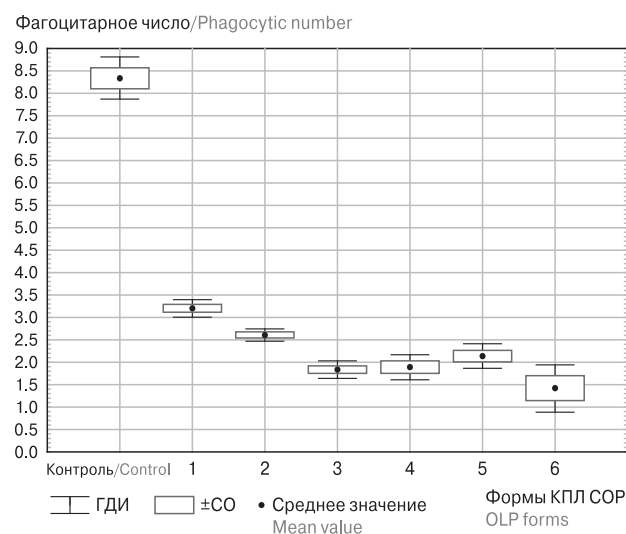


Рисунок 2. Фагоцитарное число (ФЧ) у больных разными формами КПЛ СОР

Figure 2. Phagocytic number (PN) in patients with various OLP forms

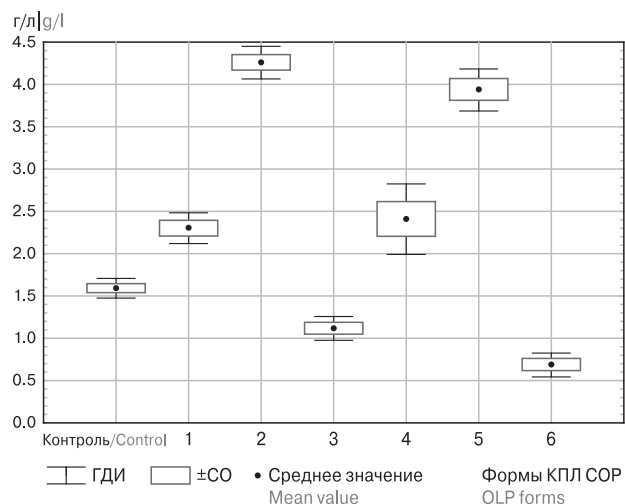


Рисунок 3. Уровень сывороточного IgA в крови у больных с разными формами КПЛ СОР

Figure 3. Serum total IgA level in patients with various OLP forms

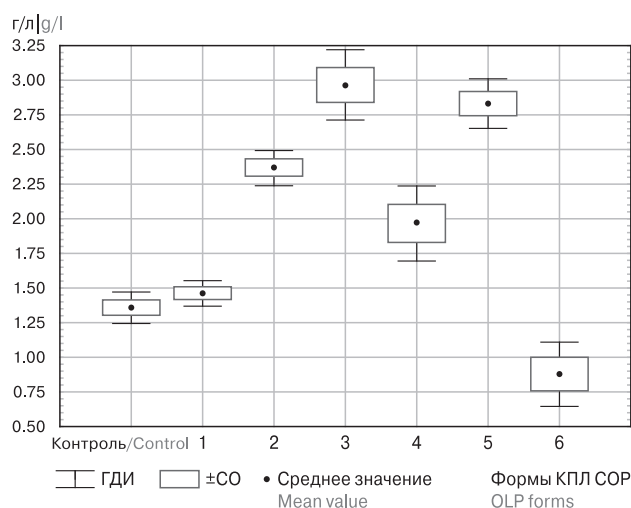


Рисунок 4. Уровень сывороточного IgM в крови у больных разными формами КПЛ СОР

Figure 4. Serum total IgM level in patients with various OLP forms

вень IgA составил $3,93 \pm 0,73$ г/л. Наиболее низкие значения сывороточного IgA отмечались у пациентов с эрозивно-язвенной и буллезной формами КПЛ СОР ($1,11 \pm 0,62$ и $0,67 \pm 0,18$ г/л) (рис. 3).

По результатам определения концентрации сывороточного IgM, отмечалась достоверная зависимость его уровня ($\eta^2 = 42\%$; $F = 46$, $p < 0,0001$) от наличия заболевания и его формы (рис. 4). Наиболее высокие средние значения сывороточного IgM отмечались у больных с экссудативно-гиперемической ($2,36 \pm 0,53$ г/л), эрозивно-язвенной ($2,96 \pm 1,11$ г/л), гипер-

кератотической ($1,96 \pm 0,72$ г/л) и атипичной ($2,83 \pm 0,56$ г/л) формами КПЛ СОР. Как и при определении сывороточного IgA, минимальные значения IgM отмечались у больных с буллезной формой КПЛ СОР. Средний уровень сывороточного IgM у данных пациентов составил $0,87 \pm 0,29$ г/л (рис. 4).

При определении сывороточного IgG была отмечена разница уровней этого иммуноглобулина в контроле и при различных формах КПЛ СОР и ($\eta^2 = 54\%$; $F = 60 < p \ll 0,0001$) (рис. 5). Максимальные уровни IgG имели место у больных с экссудативно-гиперемиче-

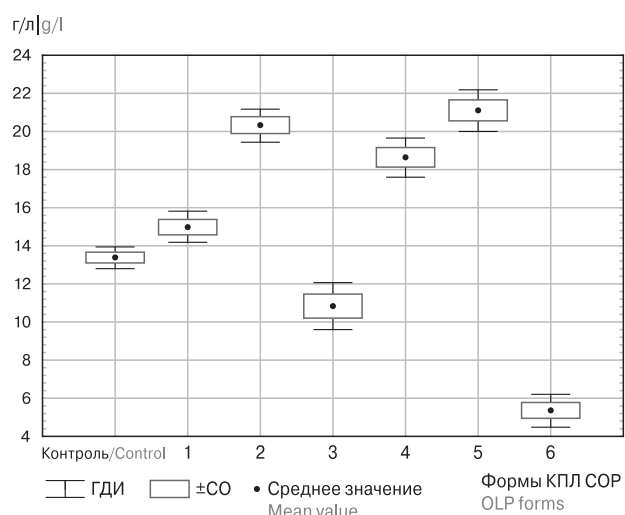


Рисунок 5. Уровень сывороточного IgG в крови у больных разными формами КПЛ СОР и у лиц в контрольной группе

Figure 5. Serum total IgG level in patients with various OLP forms

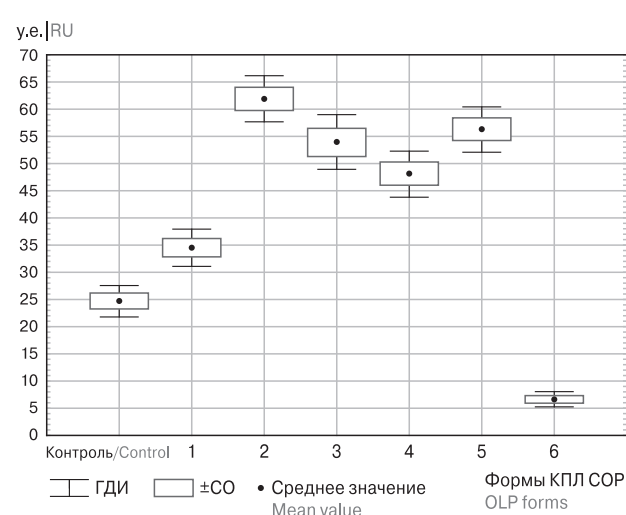


Рисунок 6. Уровень циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) у больных разными формами КПЛ СОР

Figure 6. Serum circulating immune complex level in patients with various OLP forms

ческой ($20,30 \pm 3,60$ г/л), гиперкератотической ($18,62 \pm 2,69$ г/л) и атипичной ($21,07 \pm 3,47$ г/л) формами КПЛ СОР, хотя различия между ними оказались статистически незначимыми ($p > 0,05$). Наменьшие значения сывороточного IgG отмечены у больных с эрозивно-язвенной ($10,84 \pm 5,37$ г/л) и буллезной ($5,36 \pm 1,05$ г/л) формами КПЛ СОР, что по нашему мнению, является маркером иммунологической недостаточности.

Влияние «фактора заболевания и его формы» на уровень циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) у больных КПЛ СОР оказалось умеренным ($\eta^2 = 40\%$, $F = 33$, $p \ll 0,0001$), причем отмечалась существенная разница между некоторыми формами КПЛ СОР (рис. 6).

В контроле среднее значение ЦИК составило $24,7 \pm 8,2$ у.е.; превышение верхней границы нормы этого параметра до (40 у.е.) имело место лишь в 7% случаев. У больных с типичной формой КПЛ СОР средний уровень ЦИК оказался выше $34,5 \pm 14,7$ у.е., и верхняя граница нормы была превышена в 4 раза чаще — в 28% случаев. У больных с экссудативно-гиперемической формой КПЛ СОР средний уровень ЦИК был максимальным $61,9 \pm 17,6$ у.е., верхняя граница нормы была превышена в 87% случаев. При экссудативно-гиперемической, эрозивно-язвенной, гиперкератотической и атипичной формах КПЛ СОР у больных средние уровни ЦИК были близки (от $48,0 \pm 11,3$ до $61,9 \pm 17,6$ у.е.) и значимо не различались ($p > 0,09$) (рис. 6). Минимальные ($6,7 \pm 1,9$ у.е.) значения ЦИК имели место у больных буллезной формой КПЛ.

Проведенными иммунологическими исследованиями установлен комплекс иммунопатологических реакций, характеризующихся подавлением поглотительной и метаболической активности фагоцитов, дисиммуноглобулинемией, изменениями соотношений основных популяций и субпопуляций иммунокомпетентных клеток. Высокий уровень Т-хелперов-индукторов ($CD4^+$) у больных с типичной, гиперкератотической, экссудативно-гиперемической, атипичной и эрозивно-язвенной формами заболевания характеризуется как самоподдерживающийся иммунный ответ, обусловленный подавлением элиминации патогенных агентов и, как следствие, приводящий к формированию аутоиммунного процесса. Следует отметить, что выявленный в ходе исследования комплекс иммунопатологических нарушений у больных с «буллезной» формой в виде выраженного дисфагоцитоза, дисиммуноглобулинемии 3 типа, комбинированной Т-клеточной недостаточности можно расценить как проявление вторичного иммунодефицитного состояния.

Таким образом, при оценке иммунного статуса у больных КПЛ СОР установлена взаимосвязь между проявлениями синдрома «дисфагоцитоза», нарушениями в системе гуморального и клеточного звеньев иммунитета с различными клиническими формами заболевания, что позволяет сделать заключение о патогенетической роли дисбаланса в системе механизмов, обеспечивающих элиминацию чужеродных агентов, в том числе инфекционной природы, в развитии заболевания.

Список литературы/References

1. Акмалова Г.М., Чуйкин С.В., Ронь Г.И., Чернышева Н.Д., Галимова Э.С., Гилязова И.Р., Хуснутдинова Э.К. Применение генетических маркеров в прогнозировании развития и рецидива красного плоского лишая слизистой оболочки рта // Проблемы стоматологии. 2016. Т. 12, № 1. С. 62–69. [Akmalova G.M., Chujkin S.V., Ron G.I., Chernysheva N.D., Galimova E.S., Gilyazova I.R., Khusnutdinova E.K. The use of genetic markers in predicting of oral lichen planus development and recurrence. *Problemy stomatologii = The Problems of Dentistry*, 2016, vol. 12, no. 1, pp. 62–69. doi: 10.18481/2077-7566-2016-12-1-62-69 (In Russ.)]
2. Рабинович О.Ф., Рабинович И.М., Гусева А.В., Абрамова Е.С. Новый подход к лечению пациентов с тяжелыми формами красного плоского лишая слизистой оболочки рта // Клиническая стоматология. 2015. Т. 75, № 3. С. 30–35. [Rabinovich O.F., Rabinovich I.M., Guseva A.V., Abramova E.S. New approach to treatment patients of severe forms oral lichen planus. *Klinicheskaya stomatologiya = Clinical Dentistry*, 2015, vol. 75, no. 3, pp. 30–35. (In Russ.)]
3. Ронь Г.И., Акмалова Г.М., Емельянова И.В. Оценка клинической эффективности новой композиции тизоля с триамцинолоном в комплексном лечении пациентов с эрозивно-язвенной формой красного плоского лишая слизистой оболочки рта // Стоматология. 2015. Т. 94, № 2. С. 13–15. [Ron G.I., Akmalova G.M., Emel'ianova I.V. Evaluation of the clinical efficacy of a new composition of tizol with triamcinolon in complex treatment of patients with erosive ulcerous form of lichen planus of the oral mucosa. *Stomatologiya = Dentistry*, 2015, vol. 94, no. 2, pp. 13–15. (In Russ.)]
4. Au J., Patel D., Campbell J.H. Oral lichen planus. *Oral Maxillofac. Surg. Clin. N. Am.*, 2013, vol. 25, no 1, pp. 93–100. doi: 10.1016/j.coms.2012.11.007
5. Farhi D., Dupin N. Pathophysiology, etiologic factors, and clinical management of oral lichen planus. Part I: facts and controversies. *Clin. Dermatol.*, 2010, vol. 28, no. 1, pp. 100–108. doi:10.1016/j.clinidematol.2009.03.004.
6. Firth F.A., Friedlander L.T., Parachuru V.P., Kardos T.B., Seymour G.J., Rich A.M. Regulation of immune cells in oral lichen planus. *Arch. Dermatol. Res.* 2015, vol. 307, no. 4, pp. 333–339. doi: 10.1007/s00403-015-1540-8
7. Gupta S., Jawanda M.K. Oral lichen planus: an update on etiology, pathogenesis, clinical presentation, diagnosis and management. *Indian J. Dermatol.*, 2015, vol. 60, no. 3, pp. 222–229. doi:10.4103/0019-5154.156315.

8. Lavanya N., Jayanthi P., Rao U.K., Ranganathan K. Oral lichen planus: an update on pathogenesis and treatment. *J. Oral Maxillofac. Pathol.*, 2011, vol. 15, pp. 127–32. doi: 10.4103/0973-029X.84474
9. Lopez-Jornet P., Parra-Perez F., Pons-Fuster A. Association of autoimmune diseases with oral lichen planus: a cross-sectional, clinical study. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 2014, vol. 28, no. 7, pp. 895–899. doi: 10.1111/jdv.12202
10. Mollaoglu N. Oral lichen planus: a review. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 2000, vol. 38, no. 4, pp. 370–377. doi: 10.1054/bjom.2000.0335
11. Roopashree M.R., Gondhalekar R.V., Shashikanth M.C., George J., Thippeswamy S.H., Shukla A. Pathogenesis of oral lichen planus: a review. *J. Oral Pathol. Med.*, 2010, vol. 39, no. 10, pp. 729–734. doi: 10.1111/j.1600-0714.2010.00946.x
12. Thornhill M.H. Immune mechanisms in oral lichen planus. *Acta Odontol. Scand.*, 2001, vol. 59, no. 3, pp. 174–177. doi: 10.1080/000163501750266774

Авторы:

Чуйкин С.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой стоматологии детского возраста и ортодонтии Башкирского государственного медицинского университета, г. Уфа, Россия;
Акмалова Г.М., д.м.н., доцент кафедры стоматологии детского возраста и ортодонтии, г. Уфа, Россия;
Мирсаяпова И.А., к.м.н., врач-иммунолог-аллерголог иммунологической лаборатории с отделением клинической иммунологии Республиканской детской клинической больницы, г. Уфа, Россия;
Ронь Г.И., д.м.н., профессор, зав. кафедрой терапевтической стоматологии Уральского государственного медицинского университета, г. Уфа, Россия;
Чернышева Н.Д., к.м.н., доцент кафедры терапевтической стоматологии Уральского государственного медицинского университета, г. Уфа, Россия;
Хайруллина Р.М., д.м.н., профессор, зав. иммунологической лабораторией с отделением клинической иммунологии Республиканской детской клинической больницы, г. Уфа, Россия.

Authors:

Chuykin S.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation;
Akmalova G.M., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation;
Mirsayapova I.A., PhD (Medicine), Allergist/Immunologist, Laboratory of Immunology & Clinical Immunology Unit, Republican Children's Clinical Hospital, Ufa, Russian Federation;
Ron G.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Therapeutic Dentistry, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation;
Chernysheva N.D., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Therapeutic Dentistry, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation;
Khairullina R.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Immunology & Clinical Immunology Unit, Republican Children's Clinical Hospital, Ufa, Russian Federation.

КОМПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ КОРРЕЛЯЦИОННЫХ ВЗАИМОСВЯЗЕЙ МЕЖДУ ПОКАЗАТЕЛЯМИ ГУМОРАЛЬНОГО И КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА У ЛИЦ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ ПРОТИВ ЧУМЫ

С.Н. Ключева¹, С.А. Бугоркова¹, А.Ю. Гончарова¹, А.Л. Кравцов¹, О.М. Кудрявцева¹,
Д.Н. Санджиев², С.В. Конушева², С.П. Савченко², Б.А. Хасыкова², Б.Л. Агапов³,
С.А. Щербакова¹

¹ ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», г. Саратов, Россия

² Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Республике Калмыкия, г. Элиста, Россия

³ ФКУЗ Астраханская противочумная станция, г. Астрахань, Россия

Резюме. В настоящее время продолжается поиск биомаркеров, свидетельствующих о наличии напряженно-противочумного иммунитета. Цель исследования — в динамике формирования противочумного ответа определить показатели клеточного и гуморального иммунитета у лиц, привитых вакциной чумной живой по эпидемическим показаниям, и охарактеризовать корреляционные взаимосвязи между ними. Были исследованы образцы крови от 114 человек, проживающих на территории Прикаспийского песчаного природного очага чумы. С помощью коммерческих наборов определяли спонтанную и стимулированную конканавалином А продукцию цитокинов IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, IFN γ , TNF α (Вектор-Бест, Россия) IL-17A (eBioscience, Австрия), иммуноглобулинов IgG, IgM, IgA (Вектор-Бест, Россия) на иммуноферментном анализаторе «LAZURIT» (Dyplex Technologies, США). Иммунофенотипирование лейкоцитов крови проводили с использованием меченых флуорохромами моноклональных антител Cyto-Stat CD45-FITC, CD4-PE, CD8-ECD, CD3-PC5 (Beckman Coulter, США) на проточном цитометре CyAn ADP (DakoCytomation, Дания). Анализ полученных данных установил ряд отличий по продукции определяемых цитокинов (TNF α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-17) между группами ревакцинированных и впервые вакцинированных людей. Однако клетки крови людей, независимо от кратности прививки сохраняли свою функциональную реактивность и были способны активно секретировать большинство из анализируемых цитокинов (8 из 10) в ответ на стимуляцию конканавалином А. Установлены диагностически значимые для характеристики специфического противочумного ответа изменения концентрации IFN γ , TNF α и IL-4. Для этих маркерных цитокинов выявлено наибольшее число корреляционных взаимосвязей как между собой, так и с изменением уровня других показателей: цитокинов, иммуноглобулинов, Т-клеток. Выявленные множественные корреляционные связи между показателями цитокинового и иммунного статусов свидетельствуют об активации как клеточного, так

Адрес для переписки:

Ключева Светлана Николаевна
410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, 46,
ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный
институт «Микроб».
Тел.: 8 (452) 26-21-31. Факс: 8 (452) 51-52-12.
E-mail: klyueva.cvetlana@mail.ru

Contacts:

Svetlana N. Klyueva
410005, Russian Federation, Saratov, Universitetskaya str., 46,
Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe".
Phone: +7 (452) 26-21-31. Fax: +7 (452) 51-52-12.
E-mail: klyueva.cvetlana@mail.ru

Библиографическое описание:

Ключева С.Н., Бугоркова С.А., Гончарова А.Ю., Кравцов А.Л.,
Кудрявцева О.М., Санджиев Д.Н., Конушева С.В., Савченко С.П.,
Хасыкова Б.А., Агапов Б.Л., Щербакова С.А. Комплексный анализ
корреляционных взаимосвязей между показателями гуморального
и клеточного иммунитета у лиц, вакцинированных против чумы //
Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 1. С. 135–146. doi: 10.15789/2220-
7619-2019-1-135-146

Citation:

Klyueva S.N., Bugorkova S.A., Goncharova A.Y., Kravtsov A.L.,
Sandzhiev D.N., Konusheva S.V., Savchenko S.P., Khasykova B.A.,
Agapov B.L., Shcherbakova S.A. Complex analysis of correlation
interrelations between indicators of humoral and cellular immunity in persons
vaccinated against plague // Russian Journal of Infection and Immunity =
Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 135–146. doi: 10.15789/2220-
7619-2019-1-135-146

и гуморального звеньев противочумного иммунного ответа. Показана информативность применения комплексного анализа корреляционных взаимосвязей между показателями гуморального и клеточного иммунитета у лиц, вакцинированных против чумы для оценки у них уровня иммунологической эффективности (фактической привитости) вакцинации.

Ключевые слова: вакцинация, цитокины, иммуноглобулины, Т-клетки, корреляция, иммунный ответ.

COMPLEX ANALYSIS OF CORRELATION INTERRELATIONS BETWEEN INDICATORS OF HUMORAL AND CELLULAR IMMUNITY IN PERSONS VACCINATED AGAINST PLAGUE

Klyueva S.N.^a, Bugorkova S.A.^a, Goncharova A.Y.^a, Kravtsov A.L.^a, Sandzhiev D.N.^b, Konusheva S.V.^b, Savchenko S.P.^b, Khasyikova B.A.^b, Agapov B.L.^c, Shcherbakova S.A.^a

^a Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

^b Rospotrebnadzor Administration in the Republic of Kalmykia, Elista, Russian Federation

^c Astrakhan Plague Control Station, Astrakhan, Russia

Abstract. At present, the search for biomarkers, which indicate the presence of tense antiplague immunity, is continuing. The aim of the study was to determine the parameters of cellular and humoral immunity in persons vaccinated with the plague vaccine according to epidemiological indications and to characterize the correlation interrelations between them in the dynamics of the antiplague response formation. Blood samples from 114 people living in the territory of the Pre-Caspian sandy natural plague foci were investigated. Using commercial kits, the production of cytokines IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, IFN γ , TNF α (Vector-Best, Russia) IL-17A (eBioscience, Austria), immunoglobulins IgG, IgM, IgA (Vector-Best, Russia) was determined on the enzyme immunoassay analyzer LAZURIT (Dynex Technologies, США). Blood leukocyte immunophenotyping was carried out using fluorochrome-labeled monoclonal antibodies Cyto-Stat CD45-FITC, CD4-PE, CD8-ECD, CD3-PC5 (Beckman Coulter, США) on the CyAn ADP DakoCytomation flow cytometer (Denmark). Obtained data analysis revealed a number of differences in the production of detectable cytokines (TNF α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-17) between groups of vaccinated and first-vaccinated people. However, human blood cells, regardless of the multiplicity of the graft, retained their functional reactivity and were able to actively secrete the majority of the analyzed cytokines (8 of 10) in response to stimulation with concanavalin A. Diagnostically significant changes in the concentration of IFN γ , TNF α and IL-4 were detected for the characteristics of a specific antiplague response. For these marker cytokines, the greatest number of correlations have been revealed, both with each other and with changes in the level of other parameters: cytokines, immunoglobulins, T cells. The revealed multiple correlation links between the cytokine and immune status indices indicate the activation of both the cellular and humoral components of the antiplague immune response. The informative value of the complex analysis application of correlation interrelations between the humoral and cellular immunity parameters is shown to assess the level of immunological efficacy (actual vaccination) of vaccination in persons vaccinated against plague.

Key words: vaccination, cytokines, immunoglobulins, T cells, correlation, immune response.

Введение

На фоне прогнозируемого неблагоприятного эпизоотологического прогноза по чуме на территории Прикаспийского песчаного природного очага [7] проводился комплекс противоэпидемических мероприятий, включающий массовый охват населения, проживающего на данной территории, профилактической иммунизацией согласно Приказу от 21 марта 2014 г. № 125н «Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям». Специфическую профилактику осуществляли вакциной чумной живой (ВЧЖ) из штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ, опыт применения которой на протяжении более 70 лет демонстрирует ее высокую эффективность для защиты людей от бубонной формы чумы [17].

Учитывая ключевую роль клеточного иммунитета при чуме, важно знать защитные уровни

клеточных реакций у людей, формирующихся на ВЧЖ, что и определяет продолжающийся поиск биомаркеров, свидетельствующих о наличии напряженного противочумного иммунитета [3, 6]. Для многих вакцин (в том числе, ВЧЖ) решающее значение имеет оценка Т-клеточного звена иммунитета: определение количества и функционального состояния Th1-, Th2-, Т-регуляторных клеток, Т-клеток памяти, а также оценка продукции ассоциированных с этими клетками цитокинов [12]. Большое внимание уделяют изучению значения различных цитокинов в специфическом иммунном ответе при противочумной вакцинации [3, 5]. Цитокины — низкомолекулярные белки, которые продуцируются и секретируются преимущественно активированными клетками иммунной системы и участвуют в развитии иммунных реакций по клеточному или гуморальному типу. Иммунологические механизмы с участием Th1-, Th2-, Th17-клеток и продуцируемых этими кло-

нами регуляторных цитокинов при противочумной вакцинации являются ведущими, но недостаточно изученными [14, 18]. В этой связи перспективным является метод оценки функциональной активности клеток крови по спонтанной и митогенстимулированной продукции цитокинов, основанный на анализе супернатантов культур клеток крови после их кратковременного (суточного) культивирования с охарактеризованным индуктором. В последние годы в современной иммунодиагностике активно применяют метод *ex vivo* оценки, который позволяет характеризовать спонтанную продукцию цитокинов клетками крови, свидетельствующую о том, что клетки уже активированы *in vivo*, или индуцированную (*ex vivo*) в результате методических манипуляций, отражающую потенциальные функциональные возможности активации клеток [9]. Оптимальным для характеристики Т-клеточной активности является определение концентрации цитокинов в супернатантах культуры клеток при использовании в качестве охарактеризованного митогена конканавалина А (лектин, широко применяемый в иммунологии как Т-клеточный митоген), стимуляция которым позволяет создать условную модель реакции клеток на антигенное воздействие [4].

В иммунном ответе большое значение придается оценке реакции иммуноглобулинов (IgG, IgA и IgM), изменение концентрации которых, в совокупности с другими показателями, характеризует силу и направленность гуморального ответа на антиген.

Цель исследования — в динамике формирования специфического противочумного ответа определить ключевые показатели клеточного и гуморального иммунитета у лиц, вакцинированных ВЧЖ по эпидемическим показаниям, и охарактеризовать корреляционные взаимосвязи между ними.

Материалы и методы

Обследованные лица составили 4 группы: I — 5 человек (впервые вакцинированные против чумы); II — 60 человек (однократно ревакцинированные); III — 31 человек (многократно ревакцинированные, более 3-х раз); IV — 18 человек (группа сравнения — не вакцинированные ВЧЖ).

От каждого участвующего в обследовании предварительно было получено письменное согласие на его проведение. Работа одобрена этическим комитетом при ФГБУ ВО Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского (протокол № 5 от 02.02.2016 г.). В работе использовали ВЧЖ производства ФКУЗ Ставропольский НИПЧИ (серия № 1-15, 12.03.2015–12.03.2018), представляющую собой лиофилизированную живую культуру вакцинного штамма чумного микро-

ба *Yersinia pestis* EV НИИЭГ со стабилизатором. Вакцинация проводилась подкожным способом в дозе 3×10^9 микробных клеток в 0,15 мл в соответствии с инструкцией по применению препарата.

Для исследования кровь забирали из локтевой вены в объеме 9 мл до вакцинации (I, II, III, IV группы), а также через 1 и 6 месяцев после ее проведения (I, II и III группы). В работе были использованы пробирки, содержащие гепарин и активатор свертывания.

Для определения продукции цитокинов венозную кровь с антикоагулянтом (гепарин) разводили в соотношении 1:4 средой RPMI 1640 (ПанЭко, Россия), содержащей 100 мкг/мл гентамицина (ФГУП им. Н.А. Семашко, Россия). В качестве индуктора продукции цитокинов использовали стандартный Т-клеточный митоген конканавалин А (ПанЭко, Россия) в концентрации 15 мкг/мл. Опытные и контрольные образцы инкубировали в течение 24 ч при температуре 37°C. Затем клеточную суспензию осаждали центрифугированием при 400g в течение 15 мин, полученные образцы хранили до использования при –20°C.

Сыворотку получали из венозной крови, инкубированной в пробирках с Clot Activator «VACUTEST» при 37°C в течение 1 ч. После центрифугирования при 400g сыворотку крови отбирали в отдельные микропробирки и хранили до использования при –20°C.

Спонтанную и стимулированную конканавалином А продукцию цитокинов определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью коммерческих наборов для определения IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, IFN γ , TNF α (ЗАО «Вектор-Бест», Россия), IL-17A (eBioscience, Австрия). В сыворотках крови определяли концентрации общих иммуноглобулинов IgG, IgM, IgA (ЗАО «Вектор-Бест», Россия) согласно инструкциям компании-производителя. Исследования выполняли на автоматическом иммуноферментном анализаторе «LAZURIT» (Dynex Technologies, США) при длине волны 450 нм.

Имунофенотипирование лейкоцитов крови проводили с использованием четырехцветных реагентов меченых флуорохромами моноклональных антител Cyto-Stat CD45-FITC, CD4-PE, CD8-ECD, CD3-PC5 (Beckman Coulter, США). В микрообъемах гепаринизированной цельной крови устанавливали относительное количество суммарной популяции лимфоцитов Т-клетки (CD3⁺), Т-лимфоциты хелперы (Th, CD4⁺) и цитотоксические Т-лимфоциты (Tcyt, CD8⁺) на лазерном проточном цитометре CyAn ADP (Dako-Cytomation, Дания).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием стандартного пакета программ Microsoft Office Excel 2016, Statistica 10.0 (StatSoft Inc., 2010).

Взаимосвязь между переменными определяли с помощью рангового корреляционного анализа по Спирмену. Корреляционные связи считали сильными при коэффициенте корреляции $r = 0,7-1,0$, умеренной (средней) силы — при $r = 0,3-0,7$, слабыми — при $r = 0-0,3$, r с положительным знаком — прямая связь, r с отрицательным — обратная. Достоверность уровня различия сравниваемых величин оценивали с помощью парного t -критерия Стьюдента. Корреляцию считали достоверной при $p \leq 0,05$. Полученные данные представляли в виде медианы (Me) и квартильных отклонений (Q25; Q75).

Результаты

Анализируемые 10 цитокинов по их биологическим функциям были отнесены к нескольким подгруппам (табл. 1). В то же время, учитывая полифункциональность многих цитокинов, а также возможность их продукции различными типами клеток, следует признать относительную условность такого разделения.

В ходе проведенного исследования установлено, что уровень изученных нами цитокинов у привитых против чумы лиц статистически значимо отличался от уровня не привитых. При исследовании Th1-ассоциированных цитокинов установлено, что через 1 месяц после очередной ревакцинации спонтанная продукция IFN γ у всех привитых достоверно не отличалась от показателей в группе сравнения (рис. 1). Однако через 6 месяцев после прививки (II, III группы) было получено статистически достоверное снижение в среднем в 2,2 раза спонтанной продукции IFN γ ($p = 0,048$, $p = 0,028$ соответственно). Достоверных изменений по показателям спонтанной продукции IL-2 в I и III группах во все

сроки исследования (до, через 1 и 6 месяцев после прививки) не наблюдалось, однако во II группе этот показатель был достоверно выше ($p = 0,0000001$, $p = 0,00002$, $p = 0,000047$). Отмечено разнонаправленное изменение содержания Th2-ассоциированных цитокинов на поздних сроках (6 месяцев) после прививки (рис. 1). У привитых всех групп увеличивалась спонтанная продукция IL-10 ($p = 0,047$, $p = 0,0000001$, $p = 0,00017$ соответственно) по отношению к аналогичным показателям у людей из группы сравнения. Противоположная тенденция наблюдалась по показателям IL-4, которые были достоверно снижены у всех привитых ВЧЖ в спонтанной продукции ($p = 0,007$, $p = 0,0418$, $p = 0,0048$ соответственно). В группах привитых на ранних сроках (1 месяц) после прививки наблюдалось значительное снижение спонтанной продукции TNF α ($p < 0,0001$), IL-1 β ($p < 0,000001$), IL-6 ($p < 0,001$), IL-8 ($p < 0,01$) в сравнении с аналогичными показателями непривитых лиц (рис. 2). Через 6 месяцев после прививки в III группе уровни TNF α и IL-1 β также оставались достоверно сниженными в 2,1 ($p = 0,0108$) и 2,5 ($p = 0,0017$) раза соответственно. Показатели спонтанной продукции IL-6 и IL-8 в крови всех привитых значительно возрастали в среднем в 2,9 ($p < 0,05$) и 16,4 ($p < 0,001$) раза соответственно. Следует отметить различную реакцию провоспалительных цитокинов IL-17 и IL-18 в спонтанной продукции (рис. 1, 2). Если у всех привитых концентрация IL-17 к 6 месяцу исследования статистически достоверно возрастала ($p < 0,005$), то концентрация IL-18 снижалась ($p < 0,05$)

Анализ полученных данных показал, что в продукции 6 цитокинов (TNF α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-17) в группах ревакцинированных людей имеются отличия (рис. 1, 2) от по-

Таблица 1. Классификация цитокинов по биологическим функциям [Симбирцев А.С., 2013]

Table 1. Classification of cytokines by biological functions [Simbirtsev A.S., 2013]

Группа цитокинов Group of cytokines	Цитокины Cytokines	Основные биологические функции Basic biological functions
Th1	IFN γ	Активация клеточного иммунитета Activation of cellular immunity
	IL-2	
Th2	IL-4	Активация гуморального иммунитета Activation of humoral immunity
	IL-10	
Th17	IL-17A	Активация синтеза провоспалительных цитокинов Activation of the synthesis of proinflammatory cytokines
Провоспалительные цитокины Proinflammatory cytokines	TNF α	Провоспалительное действие, регуляция апоптоза и межклеточного взаимодействия иммунокомпетентных клеток Proinflammatory action, regulation of apoptosis and intercellular interaction of immunocompetent cells
	IL-1 β	Провоспалительное действие, активация специфического иммунитета Proinflammatory effect, activation of specific immunity
	IL-18	
	IL-6	Иммунорегуляторное действие Immunoregulatory action
Хемокины Chemokines	IL-8	Регуляция хемотаксиса различных типов лейкоцитов Regulation of chemotaxis of different types of leukocytes

казателей в группе впервые вакцинированных. Выявленные отличия связаны с повышением спонтанной продукции IL-2 ($p = 0,000003$), IL-17 ($p = 0,044$) на ранних (1 месяц) сроках после ревакцинации у лиц II группы. При обследовании привитых через 6 месяцев установлено достоверное увеличение Кона-стимулированной продукции IL-4 ($p = 0,000001$), IL-6 ($p = 0,000001$) во II группе, при достоверном снижении во II и III группе TNF α ($p = 0,0406$, $p = 0,015$ соответственно), IL-1 β ($p = 0,0058$, $p = 0,0189$ соответственно).

Для характеристики функциональной активности клеток, продуцирующих исследуемые цитокины, рассчитывали индекс стимуляции (ИС) — как отношение концентрации цитокинов в Кона-стимулированных культурах к уровню их спонтанной продукции. Были выявлены различия в способности Кона стимулировать продукцию цитокинов в крови людей в зависимости от кратности вакцинации (табл. 2).

Результаты показали, что ИС IL-6 увеличился у лиц II ($p = 0,014$) и III групп ($p = 0,003$)

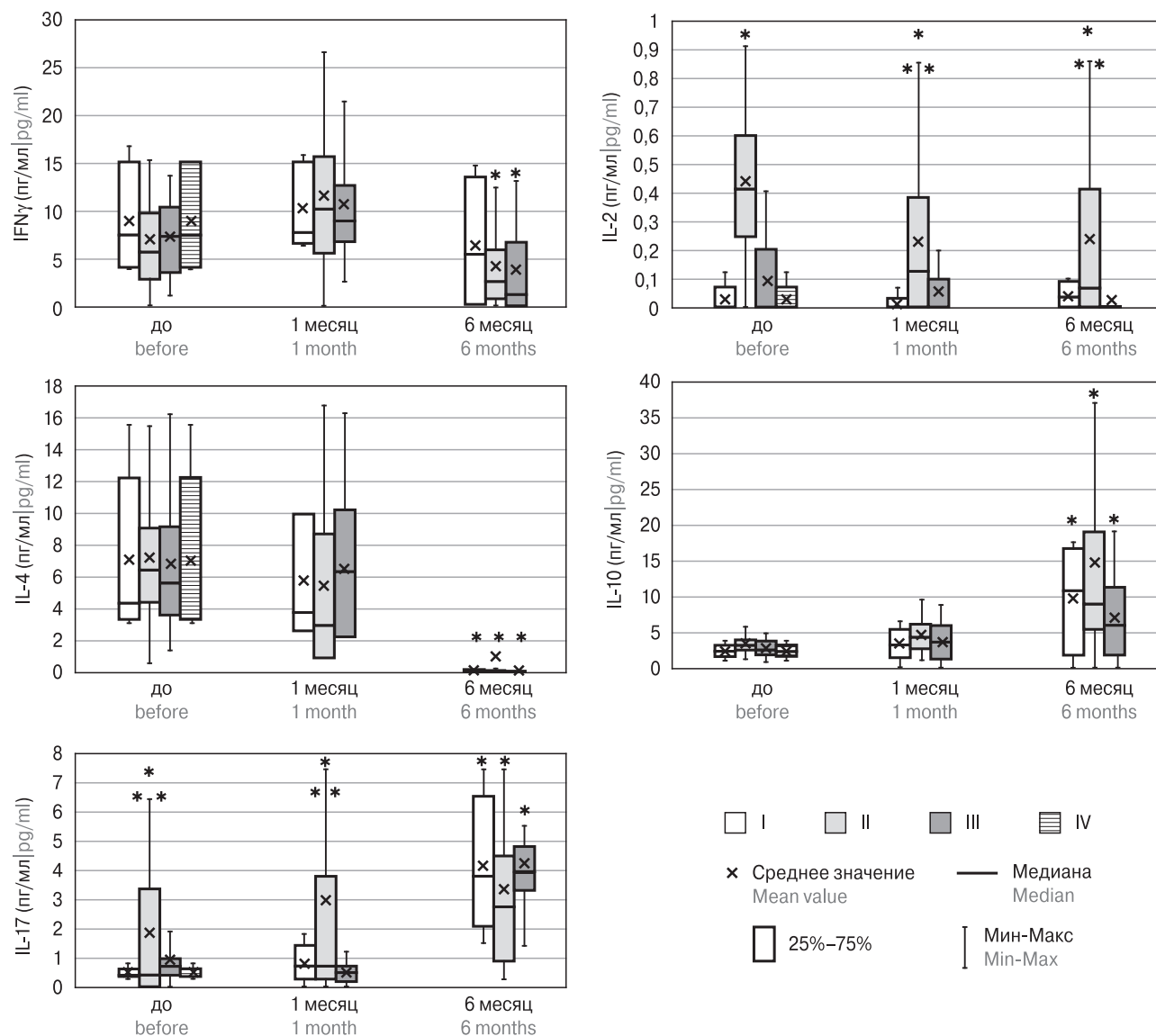


Рисунок 1. Спонтанная продукция Th1-, Th2- и Th17-ассоциированных цитокинов в крови людей до и после введения вакцины чумной живой

Figure 1. The spontaneous production of Th1, Th2 and Th17-associated cytokines in human blood before and after administration of the live plague vaccine

Примечания. I — впервые вакцинированные; II — однократно ревакцинированные; III — многократно ревакцинированные; IV — группа сравнения (не вакцинированные ВЧЖ); * — достоверность по сравнению с аналогичным показателем в группе сравнения; ** — достоверность по сравнению с аналогичным показателем в I группе ($p < 0,05$).

Notes. I — for the first time vaccinated; II — once-revaccinated; III — repeatedly revaccinated; IV — comparison group (not vaccinated); * — reliability compared to the same indicator in the comparison group; ** — reliability compared to the same indicator in group I ($p < 0.05$).

через 1 месяц после вакцинации по сравнению с показателями в I группе. Исследование через 6 месяцев позволило выявить у лиц II группы достоверное повышение ИС IL-6 ($p = 0,003$), IL-4 ($p = 0,047$), и IL-17A ($p = 0,005$), а у лиц II и III групп — ИС IL-2 ($p = 0,0039$, $p = 0,015$ соответственно) и TNF α ($p = 0,02$, $p = 0,0059$ соответственно). Через 6 месяцев ИС IFN γ , TNF α , IL-2, IL-4, IL-10, IL-17 во всех группах значительно превышал ($p < 0,05$) соответствующие значения в группе сравнения.

При оценке взаимосвязей между цитокинами ранговым анализом по Спирмену выявлены корреляционные зависимости до вакцинации в I группе между IFN γ и IL-1 β ($r = -0,9$, $p = 0,037$), IL-18 и IL-1 β ($r = 0,9$, $p = 0,037$), во II группе — между IFN γ и IL-4 ($r = 0,717$, $p < 0,00001$), IL-10

и IL-4 ($r = 0,802$, $p < 0,00001$), в III группе — между IFN γ и IL-4 ($r = 0,606$, $p = 0,0002$), TNF α и IL-4 ($r = 0,667$, $p = 0,000041$).

Через 1 месяц обнаружены корреляции в I группе между IFN γ и IL-1 β ($r = -0,9$, $p = 0,037$), IL-10 и IL-1 β ($r = -0,9$, $p = 0,037$), во II группе — между IFN γ и TNF α ($r = 0,612$, $p = 0,00003$), IFN γ и IL-10 ($r = 0,639$, $p < 0,00001$), TNF α и IL-10 ($r = 0,574$, $p = 0,00001$), IL-10 и IL-4 ($r = 0,734$, $p < 0,00001$), в III группе — между IFN γ и TNF α ($r = 0,758$, $p < 0,00001$), IFN γ и IL-10 ($r = 0,786$, $p < 0,00001$), TNF α и IL-10 ($r = 0,836$, $p < 0,00001$), IL-10 и IL-4 ($r = 0,609$, $p = 0,0001$).

Через 6 месяцев в I группе корреляционных зависимостей не выявлено. Корреляции выявлены во II группе между IFN γ и TNF α ($r = 0,788$, $p < 0,00001$), IFN γ и IL-4 ($r = 0,573$, $p = 0,000005$),

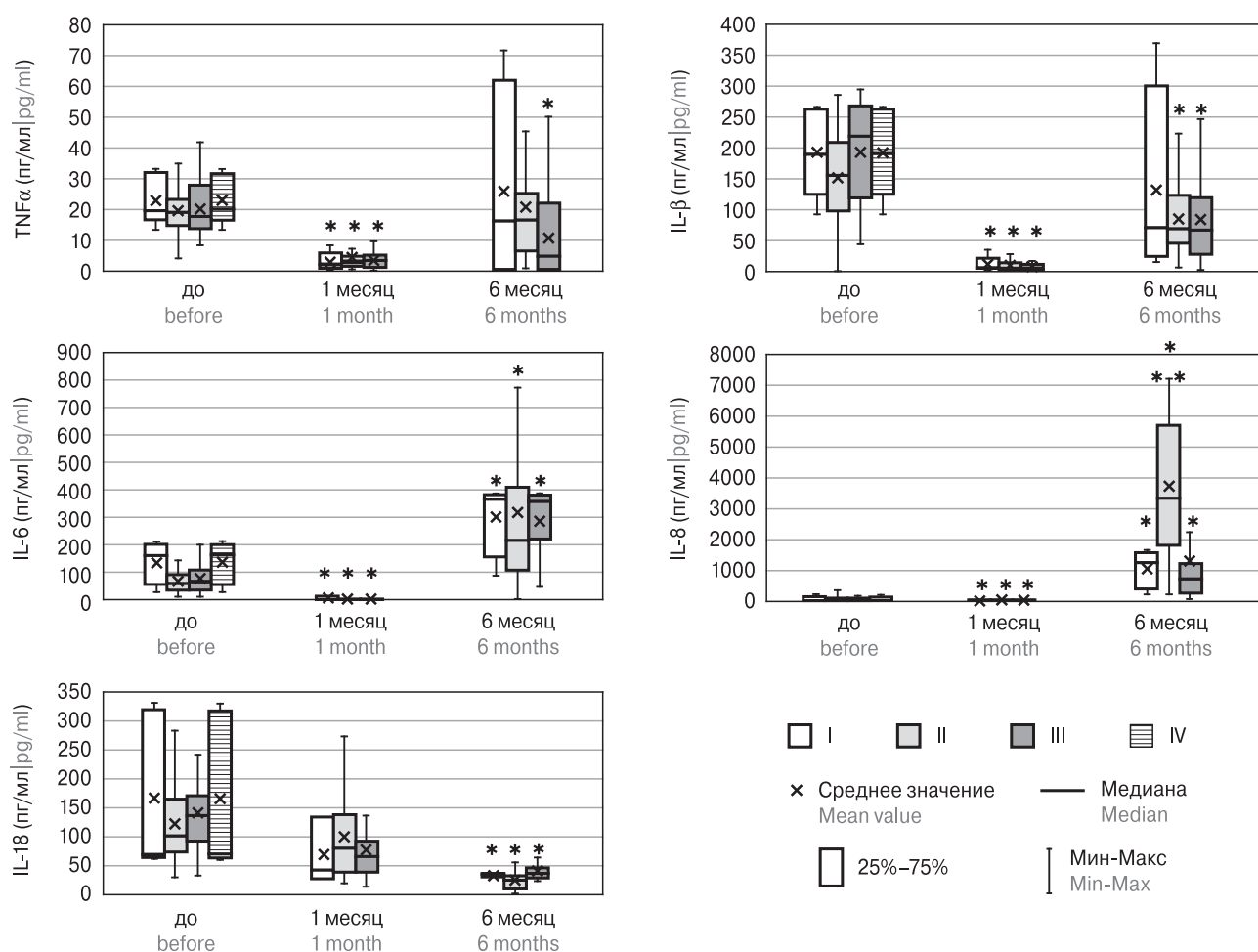


Рисунок 2. Спонтанная продукция провоспалительных цитокинов в крови людей до и после введения вакцины чумной живой

Figure 2. Spontaneous production of proinflammatory cytokines in human blood before and after administration of live plague vaccine

Примечания. I — впервые вакцинированные; II — однократно ревакцинированные; III — многократно ревакцинированные; IV — группа сравнения (не вакцинированные ВЧЖ); * — достоверность по сравнению с аналогичным показателем в группе сравнения; ** — достоверность по сравнению с аналогичным показателем в I группе ($p < 0,05$).

Notes. I — for the first time vaccinated; II — once-revaccinated; III — repeatedly revaccinated; IV — comparison group (not vaccinated); * — reliability compared to the same indicator in the comparison group; ** — reliability compared to the same indicator in group I ($p < 0,05$).

IFN γ и IL-10 ($r = 0,527$, $p = 0,00004$), TNF α и IL-4 ($r = 0,438$, $p = 0,000864$), TNF α и IL-10 ($r = 0,685$, $p < 0,00001$), в III группе — между IFN γ и TNF α ($r = 0,643$, $p = 0,0003$), IFN γ и IL-4 ($r = 0,509$, $p = 0,003$), IFN γ и IL-10 ($r = 0,464$, $p = 0,008$), TNF α и IL-4 ($r = 0,455$, $p = 0,009$), TNF α и IL-10 ($r = 0,785$, $p < 0,00001$). Таким образом, наибольшее число корреляционных связей обнаружено для IFN γ , TNF α , IL-4 и IL-10.

Для определения сдвига функционального баланса в системе Th1/Th2 клеток использовали оценку соотношения концентраций биомаркеров Th1- и Th2-ассоциированных цитокинов — IFN γ /IL-4. Уровень продукции IFN γ используют в качестве показателя напряженности специфического (Th1) клеточного иммунного ответа [8], а IL-4 — гуморального иммунного ответа [5]. Анализ динамического равновесия в системе Th1 и Th2 показал, что в группе сравнения и I группе до вакцинации ВЧЖ у 60% обследованных лиц преобладал смешанный Th1- и Th2-тип иммунного ответа. Доля вакцинированных с преимущественно клеточным или гуморальным типом была схожей — 20 и 20% соответственно. Во II и III группах для 51,6 и 35% исследуемых было характерно развитие иммунного ответа по клеточному типу, 35,5 и 51,6% — гуморальному, а у 12,9 и 13,3% — смешанному. Через 1 месяц после ревакцинации установлено повышение активности Th1, что сопровождается увеличением синтеза IFN γ . Через 6 месяцев тенденция преобладания биомаркера клеточного иммунного ответа сохраняется. В этот срок в среднем у 89,9% обследованных лиц происходило резкое снижение выработки IL-4 и, соответственно, увеличение соотношения IFN γ /IL-4.

При сравнительном анализе показателей основных классов иммуноглобулинов в сыворотках крови людей установлено (рис. 3), что через 1 месяц после прививки у лиц II и III группы уровень IgG превосходил показатели группы сравнения ($p = 0,003$ и $p = 0,00028$ соответственно), а через 6 месяцев — у лиц III группы ($p = 0,000001$).

Отмечены различия в продукции иммуноглобулинов между группами. Показано, что через 1 месяц у лиц II группы уровень IgG был в 1,4 раза выше ($p = 0,0487$), а в III группе — IgG ($p = 0,012$) в 1,5 раза и IgA ($p = 0,0263$) в 1,8 раза превышали показатели I группы. Через 6 месяцев уровень IgG у лиц III группы в 1,5 раза превышал ($p = 0,0007$) аналогичный показатель I группы. Следует отметить, что уровни IgG, IgM и IgA варьировали в пределах референсных значений (5,3–17,0; 0,5–3,0 и 0,8–4,0 мг/мл соответственно).

В ходе рангового анализа до вакцинации обнаружена достоверная корреляционная зависимость умеренной силы во II группе между IgM и IgA ($r = 0,566$, $p = 0,000002$), в III группе — между IgG и IgM ($r = 0,512$, $p = 0,0031$). Через 1 ме-

Таблица 2. Индекс стимуляции (ИС) цитокинов в крови людей, вакцинированных против чумы
Table 2. Index of stimulation (IC) of cytokines in the blood of people vaccinated against plague

Цитокин	ИС, Ме (Q25;Q75)											
	До вакцинации/Before vaccination						Срок забора крови/Term of blood sampling					
	I		II		III		I		II		III	
IFN γ	1,0 (0,89;1,38)	1,06 (0,67;1,53)	1,18 (0,78;1,42)	1,2 (0,83;1,06)	1,15 (0,92;1,45)	0,96 (0,61;1,65)	1,27 (0,88;1,72)	84,93 (54,8;365,77)**	111,2 (48,08;284,8)*	39,74 (32,1;69,89)*		
TNF α	0,91 (0,83;1,07)	1,02 (0,88;1,2)	1,11 (0,96;1,29)	1,63 (0,89;1,28)	1,4 (1,07;2,26)	1,13 (0,84;1,39)	1,27 (0,68;1,63)	8,68 (5,19;12,27)**	9,7 (5,51;22,32)**	9,88 (7,62;35,5)**		
IL-1 β	0,98 (0,075;1,01)	1,19 (0,99;1,35)	1,16 (1,01;1,33)	0,94 (0,06;0,7)	1,24 (0,65;1,81)	1,15 (0,71;1,91)	1,95 (1,0;2,55)	1,06 (1,0;12,86)	1,02 (0,54;2,53)	1,44 (1,07;3,67)		
IL-2	0,82 (0,66;1,37)	1,03 (0,85;1,22)	0,82 (0,34;1,25)	0,92 (0,7;1,23)	1,53 (0,81;2,25)	1,67 (0,84;2,83)	1,67 (0,9;3,83)	255,07 (225,71;284,44)**	285,18 (137,93;570,89)**	315,0 (279,7;529,0)**		
IL-4	0,73 (0,43;0,99)	1,0 (0,74;1,3)	0,89 (0,75;1,02)	0,89 (0,51;0,83)	1,18 (1,04;1,4)	0,86 (0,69;1,21)	1,02 (0,45;1,51)	9,52 (4,64;69,7)**	18,05 (1,75;109,72)**	2,67 (1,67;17,77)*		
IL-6	1,17 (1,12;1,21)	1,27 (1,14;1,45)	1,25 (0,91;1,56)	1,42 (1,34;1,56)	0,07 (0,03;0,12)	1,05 (0,47;3,12)	3,15 (0,93;23,65)**	1,0 (0,97;2,69)	2,38 (1,6;6,43)**	1,03 (1,03;1,72)		
IL-8	1,6 (1,18;2,08)	1,13 (1,05;1,22)	1,28 (1,12;1,46)	2,1 (1,16;2,38)	0,72 (0,71;0,96)	1,06 (0,91;3,5)	1,08 (0,91;1,82)	4,95 (4,05;16,12)	1,92 (1,1;3,43)	7,36 (4,92;17,12)**		
IL-10	1,04 (0,89;1,16)	1,03 (0,93;1,21)	0,85 (0,73;1,16)	1,44 (0,83;1,22)	1,22 (1,17;1,63)	0,96 (0,82;1,21)	1,14 (0,79;1,6)	8,4 (6,71;12,28)**	5,56 (2,85;9,76)**	7,05 (3,48;10,88)**		
IL-17A	1,0 (0,87;3,46)	0,9 (0,68;1,08)	1,28 (1,02;1,16)	1,3 (0,97;2,16)	0,8 (0,22;2,33)	1,3 (0,9;1,57)	2,0 (1,1;3,7)	30,74 (14,29;52,82)**	54,77 (31,73;98,56)**	32,43 (16,21;42,81)**		
IL-18	0,79 (0,75;0,96)	0,96 (0,84;1,14)	0,98 (0,82;1,12)	0,99 (0,8;1,0)	1,17 (0,99;1,31)	0,92 (0,78;1,02)	1,05 (0,91;1,3)	1,03 (0,98;1,08)	1,17 (0,88;1,86)	1,01 (0,96;1,11)		

Примечания. I — впервые вакцинированные; II — однократно ревакцинированные; III — многократно ревакцинированные; IV — группа сравнения (не вакцинированные ВЧЖ); * - достоверность по сравнению с аналогичным показателем в группе сравнения; ** — достоверность по сравнению с аналогичным показателем в I группе ($p < 0,05$).
Notes. I — for the first time vaccinated; II — once-revaccinated; III — repeatedly revaccinated; IV — comparison group (not vaccinated); * — reliability compared to the same indicator in the comparison group; ** — reliability compared to the same indicator in group I ($p < 0,05$).

сяц после ревакцинации корреляция умеренной силы выявлена во II группе между IgM и IgA ($r = 0,518$, $p = 0,00013$). Через 6 месяцев корреляций не обнаружено.

Определенные корреляционные взаимоотношения были выявлены между цитокинами и иммуноглобулинами. Через 1 месяц после вакцинации в I группе определялась корреляционная зависимость между IFN γ и IgG, IFN γ и IgM ($r = 0,9$, $p = 0,037$), в III группе — между IL-6 и IgG ($r = 0,637$, $p = 0,00013$), IFN γ и IgM ($r = 0,479$, $p = 0,0063$), IL-6 и IgA ($r = 0,402$, $p = 0,0246$), IL-8 и IgA ($r = 0,366$, $p = 0,0428$). На поздних сроках иммунного ответа (6 месяцев) умеренная степень корреляционного взаимодействия выявлялась во II группе между IL-2 и IgG ($r = 0,323$, $p = 0,017$), IL-4 и IgG ($r = -0,431$, $p = 0,0011$), в III группе — между IFN γ и IgA ($r = -0,454$, $p = 0,017$). По итогам данного анализа наибольшее число выявленных корреляционных взаимосвязей установлено для IFN γ и IgG.

Методом проточной цитофлуориметрии было проведено определение относительного содержания субпопуляций Т-клеток в крови лиц до и после применения ВЧЖ (табл. 3). Через 1 ме-

сяц у всех привитых отмечено повышение количества Т-лимфоцитов хелперов (CD4 $^{+}$) по сравнению с аналогичными показателями в группе сравнения (соответственно $p = 0,02$, $p = 0,0002$, $p = 0,0018$). Кроме того, через 1 месяц после прививки количество Т-клеток (CD3 $^{+}$) во II ($p = 0,0128$) и III группах ($p = 0,0015$) достоверно превосходило аналогичные показатели, зарегистрированные через 6 месяцев после прививки.

Далее был установлен ряд зависимостей между содержанием Т-клеток и концентрациями цитокинов. В I группе до и через 1 месяц после вакцинации установлена обратная корреляционная зависимость между IL-1 β и CD8 $^{+}$ Т-лимфоцитами ($r = -0,9$, $p = 0,037$). Корреляционная связь умеренной силы выявлена во II группе между IL-1 β и CD4 $^{+}$ Т-лимфоцитами до вакцинации ($r = 0,368$, $p = 0,0418$) и через 1 ($r = -0,339$, $p = 0,049$), 6 месяцев ($r = 0,310$, $p = 0,0223$) после вакцинации, а также в III группе до вакцинации ($r = -0,424$, $p = 0,019$). Обнаружена взаимосвязь между IL-4 и CD3 $^{+}$ Т-лимфоцитами до вакцинации в I группе ($r = -0,900$, $p < 0,037$), через 6 месяцев — во II ($r = -0,317$, $p = 0,0192$) и III группах ($r = -0,535$, $p = 0,0247$).

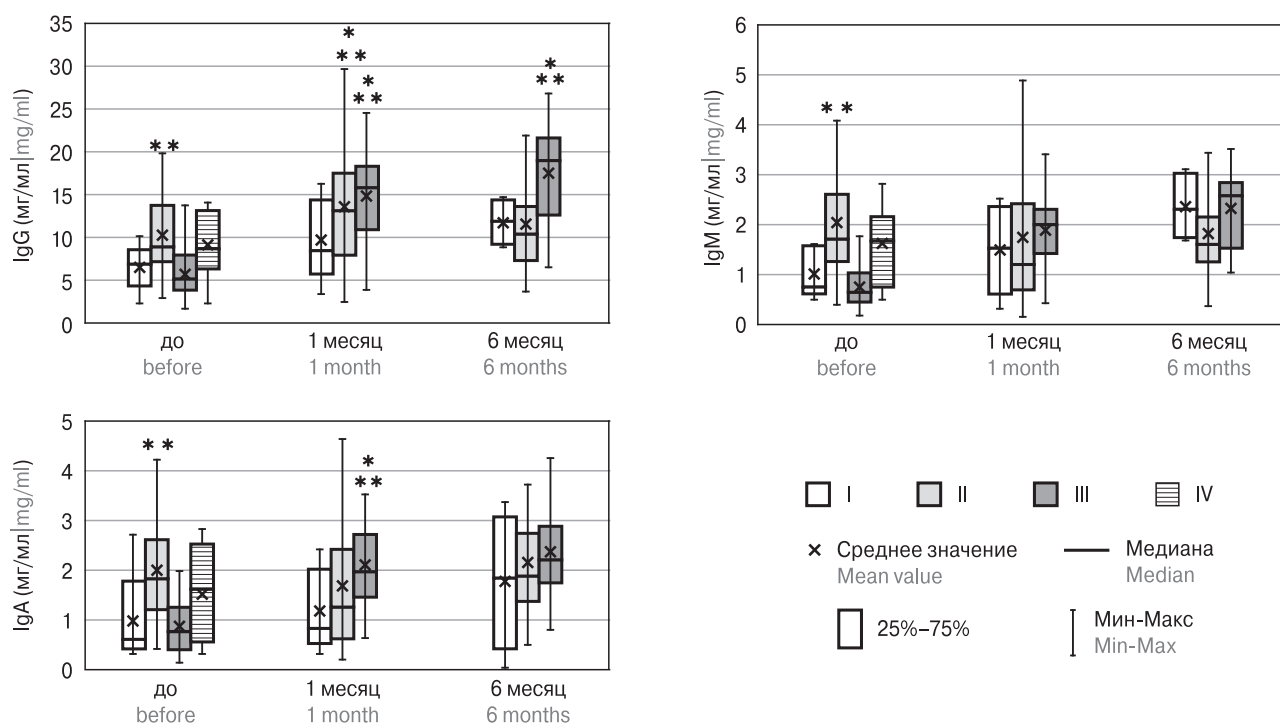


Рисунок 3. Уровень основных классов иммуноглобулинов (IgG, IgM и IgA) у людей до и после введения вакцины чумной живой

Figure 3. The level of the main classes of immunoglobulins (IgG, IgM and IgA) in humans before and after the introduction of live plague vaccine

Примечания. I — впервые вакцинированные; II — однократно ревакцинированные; III — многократно ревакцинированные; IV — группа сравнения (не вакцинированные ВЧЖ); * — достоверность по сравнению с аналогичным показателем в группе сравнения; ** — достоверность по сравнению с аналогичным показателем в I группе ($p < 0,05$).

Notes. I — for the first time vaccinated; II — once-revaccinated; III — repeatedly revaccinated; IV — comparison group (not vaccinated); * — reliability compared to the same indicator in the comparison group; ** — reliability compared to the same indicator in group I ($p < 0,05$).

Таблица 3. Относительное содержание субпопуляций Т-клеток в крови лиц, привитых против чумы
 Table 3. The relative content of T-cell subpopulations in the blood of persons vaccinated against the plague

Группа Group	Срок после вакцинации в месяцах Term after vaccination in months	Исследуемый показатель, % (M±m) The indicator studied, % (M±m)		
		Th (CD4 ⁺)	Tcvt (CD8 ⁺)	Т-клетки (CD3 ⁺) T-cells (CD3 ⁺)
I	0	34,004±3,1	30,89±2,31	68,58±4,12
	1	43,308±3,04*	25,502±1,52	70,98±3,9
	6	35,73±5,57	24,92±2,91	64,32±5,18
II	0	40,64±0,89	26,46±0,84	70,347±1,23
	1	44,59±0,96*	27,83±1,46	72,66±2,05**
	6	39,01±0,99	29,31±0,85	66,87±1,0
III	0	38,85±1,61	26,41±1,4	68,07±1,78
	1	43,43±1,43*	24,55±1,34	71,32±1,76**
	6	37,507±1,8	23,825±2,35	62,51±1,99
IV	0	33,06±2,8	29,76±2,03	67,43±3,74
Референтные границы нормы от производителя моноклональных антител Reference norm limits from the manufacturer of monoclonal antibodies		35–50	25–35	58–85

Примечания. I — впервые вакцинированные; II — однократно ревакцинированные; III — многократно ревакцинированные; IV — группа сравнения (не вакцинированные ВЧЖ); * — достоверность по сравнению с аналогичным показателем в группе сравнения; ** — достоверность по сравнению с аналогичным показателем в I группе ($p < 0,05$).

Notes. I — for the first time vaccinated; II — once-revaccinated; III — repeatedly revaccinated; IV — comparison group (not vaccinated); * — reliability compared to the same indicator in the comparison group; ** — reliability compared to the same indicator in group I ($p < 0.05$).

Во все сроки исследования корреляционных зависимостей между показателями уровня иммуноглобулинов и реакцией Т-клеток не установлено.

Обсуждение

Выявленное нами изменение содержания цитокинов у большинства людей свидетельствует об адекватной иммунной перестройке организма в ответ на введение ЖЧВ. Анализ полученных данных установил ряд отличий по продукции изученных цитокинов (TNF α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-17) между группами ревакцинированных и впервые вакцинированных людей. Выявленные отличия связаны с повышением спонтанной продукции Th1- (IL-2), Th17-ассоциированных цитокинов (IL-17) и КонА-стимулированной продукции Th2 (IL-4), а также провоспалительного цитокина IL-6 у однократно ревакцинированных лиц. Уменьшение стимулированной продукции провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-1 β), наблюдавшееся у людей однократно или многократно ревакцинированных, возможно свидетельствует о некотором снижении резервных возможностей для функциональной активации клеток иммунной системы (нейтрофилов, макрофагов) в ответ на многократное поступление антигена. В динамике продукции остальных четырех цитокинов (IFN γ , IL-8, IL-10, IL-18), независимо от кратности прививки, существенных отличий не выявлено. Однако проведенные исследования показали, что клетки крови людей, независимо

от кратности применения ЖЧВ, сохраняют свою функциональную реактивность и, также как клетки у лиц впервые встречающихся с чумным микробом вакцинного штамма, способны активно секретировать большинство (8) из анализируемых нами цитокинов (IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN γ , TNF α , IL-17A) в ответ на стимуляцию агонистом TLR2 — конканавалином А [16].

Существенное превышение концентрации IFN γ по сравнению с IL-2 и TNF α при противочумной вакцинации обусловлено, вероятно, его выраженной полифункциональностью — противовирусная и иммуномодулирующая активность и обеспечение регуляции клеточной пролиферации [8]. В отличие от интерферонов I (IFN α/β) и III (IFN λ) типов, продуцируемых различными клетками человеческого организма в основном в ответ на вирусную инфекцию, продукция IFN γ , являющегося единственным представителем II типа интерферонов, специфична для активированных клеток иммунной системы: Th-1, цитотоксических лимфоцитов, натуральных киллеров и антигенпрезентирующих клеток. Кроме непосредственного действия на системы репродукции вирусов, IFN γ является важным медиатором иммунитета, отражающим взаимосвязь между макрофагами и лимфоцитами, регуляцию клеточного и гуморального иммунитета, что позволяет отнести его к семейству иммунорегуляторных цитокинов.

При анализе группы Th2-ассоциированных цитокинов привлекло внимание значительное преобладание спонтанной и КонА-стимулированной продукции IL-10 над уровнем про-

дукции IL-4 в более поздний срок иммунного ответа (6 месяцев). Возможно, это обусловлено их однонаправленным характером стимуляции гуморального иммунитета или особенностями влияния на подавление активности провоспалительных цитокинов макрофагами для поддержания нормального баланса регуляции воспалительных процессов у здорового человека. Кроме того, IL-10 является ингибитором пролиферации Т-лимфоцитов, вызываемой аллергеном или митогеном в культуре мононуклеарных клеток, ингибирует синтез цитокинов моноцитами, вызывает дифференцировку В-лимфоцитов в плазматические клетки, подавляет синтез воспалительных цитокинов [4].

Повышение ИС Th1- (IFN γ , IL-2), Th2- (IL-4, IL-10), Th17-ассоциированных цитокинов (IL-17), провоспалительного цитокина TNF α свидетельствует об увеличении резервных функциональных возможностей клеток иммунной системы в ответ на ВЧЖ. Общим для IL-1 β , IL-6 и IL-18 было отсутствие подъема ИС, что, вероятно, связано с общей направленностью их биологических функций [1].

Изначально высокие уровни IL-18, IL-1 β и IL-4 до прививки ВЧЖ связаны как с про-, так и противовоспалительной активностью IL-18. Известно о плейотропных эффектах IL-18 в отношении многих типов клеток и его влиянии на секрецию различных по своей функциональной направленности медиаторов. Есть данные о стимулирующем действии IL-18 на продукцию провоспалительного IL-1 β и противовоспалительного IL-4 [13].

Отличие в реакции иммуноглобулинов на первичное и повторное применение ВЧЖ, обусловлено более быстрым повышением уровня IgG. Эффекторные функции антител связаны с особенностями Fc-фрагментов и поэтому различаются у разных классов и подклассов иммуноглобулинов. На мембранах многих клеток, особенно лейкоцитов, экспрессированы рецепторы для Fc-фрагментов иммуноглобулинов — FcR [12]. Многие цитокины, такие как IFN γ , G-CSF, TGF β , стимулируют экспрессию и функции Fc γ R, а IL-4, TNF α — угнетают. Таким образом, повышение количества общих иммуноглобулинов после ревакцинации свидетельствует об адекватном иммунном ответе на специфическую стимуляцию, сопровождающуюся выработкой антител, что указывает на развитие гуморального ответа в ответ на ВЧЖ. Наличие множественных корреляционных зависимостей между концентрацией в крови ряда цитокинов и иммуноглобулинов (IFN γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IgG, IgM, IgA) свидетельствует о развитии не только клеточного, но и гуморального иммунного ответа на ВЧЖ.

Согласно существующему представлению, тип иммунного ответа может быть классифицирован на основании продуцируемых специ-

фическими клетками Т-хелперами цитокинов. Т-хелперы 1 класса (Th-1) продуцируют IL-2, IFN γ и координируют клеточный иммунный ответ. Т-хелперы 2 (Th-2) класса координируют, в основном, гуморальный иммунный ответ, продуцируя IL-4, IL-10, IL-13 и другие цитокины [11]. Увеличение продукции IFN γ в ответ на вакцинацию свидетельствует о повышении активности Th1-клеток и активации клеточного звена противочумного иммунитета.

В ранее проведенных нами исследованиях были выявлены наиболее информативные цитокины-маркеры (IFN γ и TNF α) для оценки уровня противочумного клеточного иммунного ответа [3]. Опираясь на данные настоящего исследования к вышеперечисленным цитокинам можно отнести и IL-4. Именно эти цитокины (IFN γ , TNF α , IL-4) имеют наибольшее активирующее действие на иммунный ответ, коррелируя между собой, с концентрациями других цитокинов, иммуноглобулинов, Т-клетками. IFN γ является важнейшим провоспалительным цитокином, продукция которого ассоциирована с активированными Т-лимфоцитами и натуральными киллерами (CD16 $^+$). TNF α считают одним из наиболее важных факторов защиты хозяина, ранним источником которого являются макрофаги, нейтрофилы и дендритные клетки. Основная функция IL-4 — это контроль пролиферации, дифференцировки и функций В-лимфоцитов, то есть антительного ответа.

Большинство из известных на сегодняшний день цитокинов ассоциированы с Т-клетками и другими клеточными типами (гранулоцитами, макрофагами, фибробластами, В-клетками). Продукция основной части цитокинов начинается после антигенной или митогенной стимуляции Т-клеток и является, таким образом, одним из показателей функциональной зрелости этих клеток. Однако некоторые цитокины продуцируются и наивными Т-клетками. Увеличение относительного количества CD4 $^+$ лимфоцитов у всех обследованных респондентов в ответ на прививку может свидетельствовать об активации хелперной популяции лимфоцитов, что согласуется с данными ранее проведенных исследований, отметивших значимое повышение Th1-лимфоцитов — клеток иммунологической памяти (CD45 $^+$ CD4 $^+$ CD62L $^-$ CD45RA $^-$ CD45RO $^+$) на ВЧЖ [2].

Наличие корреляционных взаимосвязей между IL-1 β , IL-4, CD4 $^+$, CD8 $^+$, CD3 $^+$ указывает на формирование как провоспалительной, так и противовоспалительной составляющей при развитии противочумного иммунного ответа. Известно, что IL-1 β является главным медиатором развития местной воспалительной реакции и острофазового ответа на уровне организма при вакцинации [10]. Кроме того, IL-1 β , продуцируемый нейтрофилами, макрофагами, естественными киллерами, стимулирует врожденное звено

иммунитета, воздействуя на функциональную активность Т- и В-лимфоцитов. IL-4 является основным фактором в определении дифференцировки стимулированных антигеном наивных CD4⁺ Т-клеток в Th2 [15]. Отсутствие взаимосвязей между количеством иммуноглобулинов и Т-клетками доказывает ведущую роль клеточного звена иммунной системы в формировании и реализации противочумного иммунитета.

Таким образом, характер выявленных взаимосвязей между рядом цитокинов, иммуноглобулинов и субпопуляциями Т-лимфоцитов свидетельствует об информативности применения корреляционного анализа для характеристики формирования поствакцинального противочумного иммунитета и оценки уровня иммунологической эффективности (фактической привитости) ВЧЖ.

Список литературы/References

1. Белова О.В., Арион В.Я., Сергиенко В.И. Роль цитокинов в иммунологической функции кожи // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2008. № 1. С. 41–55. [Belova O.V., Arion V.Ya., Sergienko V.I. Role of cytokines in immunological function of the skin. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2008, no. 1, pp. 41–55. (In Russ.)]
2. Богачева Н.В., Крючков А.В., Дармов И.В., Воробьев К.А., Печенкин Д.В., Елагин Г.Д., Колесников Д.П. Экспериментальная оценка методом проточной цитофлюориметрии уровня клеточной иммунологической памяти у лиц, вакцинированных против чумы и сибирской язвы // Клиническая лабораторная диагностика. 2013. № 11. С. 48–53. [Bogatcheva N.V., Kryutchkov A.V., Darmov I.V., Vorobiyev K.A., Petchenkin D.V., Elagin G.D., Kolesnikov D.P. The experimental evaluation with flow cytofluorimetry technique of the level of cellular immunologic memory in persons vaccinated against plague and anthrax. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2013, no. 11, pp. 48–53. (In Russ.)]
3. Ключева С.Н., Бугоркова С.А., Шуковская Т.Н., Санджиев Д.Н., Конушева С.В., Савченко С.П., Хасыкова Б.А., Щербакова С.А. Оценка уровня гуморального и клеточного иммунитета после ревакцинации против чумы лиц, проживающих на территории Прикаспийского песчаного природного очага // Медицинская иммунология. 2018. Т. 20, № 2. С. 241–250. [Klyueva S.N., Bugorkova S.A., Shchukovskaya T.N., Sandzhiev D.N., Konusheva S.V., Savchenko S.P., Khasykova B.A., Shcherbakova S.A. Evaluation of humoral and cellular immunity level among persons living in the Caspian natural sandy focus territory after anti-plague revaccination. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, vol. 20, no. 2, pp. 241–250. doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-241-250 (In Russ.)]
4. Коненков В.И., Авдошина В.В., Ракова И.Г., Смольникова М.В., Гельфгат Е.Л. Комплексная оценка уровня ConA-индуцированной продукции цитокинов в культуре мононуклеарных клеток периферической крови здоровых лиц // Медицинская иммунология. 2006. Т. 8, № 4. С. 517–522. [Konenkov V.I., Avdoshina V.V., Rakova I.G., Smolninkova M.V., Gelfgat E.L. Multiplex evaluation of ConA-induced production of twelve cytokines in the cultures of mononuclear cells from peripheral blood of healthy subjects. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2006, vol. 8, no. 4, pp. 517–522. doi: 10.15789/1563-0625-2006-4-517-522 (In Russ.)]
5. Корытов К.М., Войткова В.В., Дубровина В.И., Носков А.К., Мищенко А.И., Балахонov С.В. Оценка иммунологической эффективности вакцинации против чумы в активном природном очаге. Сообщение 1. Цитокиновый и иммуноглобулиновый статус // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2017. Т. 16, № 2 (93). С. 45–49. [Korytov K.M., Voytkova V.V., Dubrovina V.I., Noskov A.K., Mishchenko A.I., Balakhonov S.V. Immunological Efficiency of Plague Vaccination in the Active Natural Focus. Report 1. Cytokine and immunoglobulin status. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2017, vol. 16, no. 2 (93), pp. 45–49. (In Russ.)]
6. Куличенко А.Н., Абзаева Н.В., Гостищева С.Е., Ракитина Е.Л., Пономаренко Д.Г., Костюченко М.В. Использование антигенспецифических клеточных тестов in vitro для оценки формирования поствакцинального противочумного иммунитета // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 2. С. 203–208. [Kulichenko A.N., Abzaeva N.V., Gostischeva S.E., Rakitina E.L., Ponomarenko D.G., Kostuchenko M.V. Using the antigen-specific cell in vitro tests to assess the formation of post-vaccination immunity antiplague. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, vol. 7, no. 2, pp. 203–208. doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-203-208 (In Russ.)]
7. Кутырев В.В., Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Пакскина Н.Д., Безсмертный В.Е., Топорков В.П., Попов Н.В., Кабин В.В., Яшкулов К.Б., Бамматов Д.М., Ковтунов А.И., Санджиев Д.Н., Зенкевич Е.С., Гражданов А.К., Матросов А.Н., Кузнецов А.А., Шарова И.Н., Лопатин А.А., Григорьев М.П., Куличенко А.Н. Обеспечение эпидемиологического благополучия по чуме в условиях обострения эпизоотической обстановки в Прикаспийском песчаном природном очаге в 2014 г. // Проблемы особо опасных инфекций. 2015. № 4. С. 22–29. [Kutyrev V.V., Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Y.V., Pakskina N.D., Bezsmertny V.E., Toporkov V.P., Popov N.V., Kabin V.V., Yashkulov K.B., Bammatov D.M., Kovtunov A.I., Sandzhiev D.N., Zenkevich E.S., Grazhdanov A.K., Matrosov A.N., Kuznetsov A.A., Sharova I.N., Lopatin A.A., Grigor'ev M.P., Kulichenko A.N. Provision of epidemiological welfare on plague under aggravation of epizootic situation in the Pre-Caspian sandy natural plague focus in 2014. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2015, vol. 4, pp. 22–29. doi: 10.21055/0370-1069-2015-4-22-29 (In Russ.)]
8. Луцкий А.А., Жирков А.А., Лобзин Д.Ю., Рао М., Алексеева Л.А., Мейерер М., Лобзин Ю.В. Интерферон-γ: биологическая функция и значение для диагностики клеточного иммунного ответа // Журнал инфектологии. 2015. Т. 7, № 4. С. 10–22. [Lutckii A.A., Zhirkov A.A., Lobzin D.Yu., Rao M., Alekseeva L.A., Maeurer M., Lobzin Y.V. nterferon-γ: biological function and application for study of cellular immune response. *Zhurnal infektologii = Journal of Infectology*, 2015, vol. 7, no. 4, pp. 10–22. doi: 10.22625/2072-6732-2015-7-4-10-22 (In Russ.)]

9. Рыжикова С.Л., Дружинина Ю.Г., Рябичева Т.Г., Вараксин Н.А. Стандартизация методики определения продукции цитокинов клетками крови ex vivo // Клиническая лабораторная диагностика. 2011. № 11. С. 49–53. [Ryzhikova S.L., Druzhinina Yu.G., Ryabicheva T.G., Varaksin N.A. The standardization of technique of detection of blood cells cytokine production ex vivo. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2011, no. 11. pp. 49–53. (In Russ.)]
10. Симбирцев А.С. Интерлейкин-1: от эксперимента в клинику // Медицинская иммунология. 2001. Т. 3, № 3. С. 431–438. [Interleukin-1: from experiment to clinic. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2001, vol. 3, no. 3, pp. 431–438. (In Russ.)]
11. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе инфекционных и неинфекционных заболеваний человека // Медицинский академический журнал. 2013. Т. 13, № 3. С. 18–41 [Simbirtsev A.S. Cytokines in the pathogenesis of infectious and noninfectious human diseases. *Meditsinskiy akademicheskij zhurnal = Medical Academic Journal*, 2013, vol. 13, no. 3, pp. 18–41. (In Russ.)]
12. Фрейдлин И.С. Регуляторные Т-клетки: происхождение и функции // Медицинская иммунология. 2005. Т. 7, № 4. С. 347–354. [Freidlin I.S. Regulatory T-cells: origin and function. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2005, vol. 7, no. 4, pp. 347–354. doi: 10.15789/1563-0625-2005-4-347-354 (In Russ.)]
13. Якушенко Е.В., Лопатникова Ю.А., Сенников С.В. Интерлейкин 18 и его роль в иммунном ответе // Медицинская иммунология. 2005. Т. 7, № 4. С. 355–364. [Yakushenko E.V., Lopatnikova J.A., Sennikov S.V. IL-18 and immunity. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2005, vol. 7, no. 4, pp. 355–364. doi: 10.15789/1563-0625-2005-4-355-364 (In Russ.)]
14. Lin J.S., Kummer L.W., Szaba F.M., Smiley S.T. IL-17 contributes to cell-mediated defense against pulmonary *Yersinia pestis* infection. *J. Immunol.*, 2011, vol. 186, no. 3, pp. 1675–1684. doi: 10.4049/jimmunol.1003303
15. Silva-Filho J.L., Caruso-Neves C., Pinheiro A.A.S. IL-4: an important cytokine in determining the fate of T cells. *Biophys. Rev.* 2014, vol. 6, no. 1, pp. 111–118. doi: 10.1007/s12551-013-0133-z
16. Sodhi A., Tarang S., Kesharwani V. Concanavalin A induced expression of Toll-like receptors in murine peritoneal macrophages in vitro. *Int. Immunopharmacol.*, 2007, vol. 7, no. 4, pp. 454–463. doi: 10.1016/j.intimp.2006.11.014
17. Sun W., Roland K.L., Curtiss R. Developing live vaccines against *Yersinia pestis*. *J. Infect. Dev. Ctries*, 2011, vol. 5, no. 9, pp. 614–627.
18. Wang X., Wang Z., Guo Z., Wei B., Tian F., Yu S., Wang H., Wang H., Yang R. Serum cytokine responses in primary pneumonic plague patients. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2011, vol. 18, no. 1, pp. 184–186. doi:10.1128/CVI.00386-10

Авторы:

Ключева С.Н., к.б.н., научный сотрудник отдела иммунологии ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», г. Саратов, Россия;

Бугоркова С.А., д.м.н., зав. отделом иммунологии ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», г. Саратов, Россия;

Гончарова А.Ю., к.м.н., научный сотрудник отдела иммунологии ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», г. Саратов, Россия;

Кравцов А.Л., д.б.н., ведущий научный сотрудник отдела иммунологии ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», г. Саратов, Россия;

Кудрявцева О.М., к.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», г. Саратов, Россия;

Санджиев Д.Н., руководитель Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Республике Калмыкия и Главный государственный санитарный врач по Республике Калмыкия, г. Элиста, Россия;

Конушева С.В., зам. руководителя Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Республике Калмыкия, заместитель главного государственного санитарного врача по Республике Калмыкия, г. Элиста, Россия;

Савченко С.П., начальник отдела эпидемиологического надзора Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Республике Калмыкия, г. Элиста, Россия;

Хасыкова Б.А., заместитель начальника ТО «Северо-Восточный» Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Республике Калмыкия в Черноземельском районе, г. Элиста, Россия;

Агапов Б.Л., врио директора ФКУЗ Астраханская противочумная станция, г. Астрахань, Россия;

Щербаклова С.А., д.б.н., зам. директора по научной и экспериментальной работе ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», г. Саратов, Россия.

Authors:

Klyueva S.N., PhD (Biology), Researcher, Department of Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;

Bugorkova S.A., PhD, MD (Medicine), Head of the Department of Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;

Goncharova A.Yu., PhD (Medicine), Researcher, Department of Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;

Kravtsov A.L., PhD, MD (Biology), Leading Researcher, Department of Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;

Kudryavtseva O.M., PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;

Sandzhiev D.N., Head of Rospotrebnadzor Administration in the Republic of Kalmykia, Main State Sanitary Doctor of the Republic of Kalmykia, Elista, Russian Federation;

Konusheva S.V., Deputy Head, Rospotrebnadzor Administration in the Republic of Kalmykia, Deputy Main State Sanitary Doctor of the Republic of Kalmykia, Elista, Russian Federation;

Savchenko S.P., Head of Epidemiological Surveillance, Rospotrebnadzor Administration in the Republic of Kalmykia, Elista, Russian Federation;

Khasykova B.A., Deputy Head of the Territorial Department "North-East", Rospotrebnadzor Administration in the Republic of Kalmykia, Elista, Russian Federation;

Agapov B.L., Temporary Duty Director, Astrakhan Plague Control Station, Astrakhan, Russian Federation;

Shcherbakova S.A., PhD, MD (Biology), Deputy Director, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation.

ОЦЕНКА ЧАСТОТЫ И УСЛОВИЙ ИНФИЦИРОВАНИЯ ВИРУСАМИ TTV И HGV У ДЕТЕЙ С ВПЕРВЫЕ УСТАНОВЛЕННЫМ ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ ЛЕЧЕНИЯ

Л.Ю. Послова^{1,2}, А.Б. Алексеев², А.В. Сергеева¹, О.В. Ковалишена¹, В.В. Шкарин¹,
Н.Е. Сенягина¹, Н.Ф. Бруснигина³, Т.Ю. Бутина³

¹ ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет МЗ РФ, Нижний Новгород, Россия

² ГБУЗ Нижегородская областная детская клиническая больница, Нижний Новгород, Россия

³ ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия

Резюме. В настоящее время исследователи предполагают участие TTV и HGV в формировании различных острых и хронических процессов (заболеваний печени, дыхательных путей, онкологических, болезней крови, гематологических нарушений и др.). Распространению HGV- и TTV-инфекций способствует использование инфицированной крови и ее продуктов. Изучение роли HGV и TTV в этиологической структуре поражения печени у детей с острым лимфобластным лейкозом, взаимосвязи данных инфекций с развитием токсического поражения печени на фоне проводимой терапии представляет особый интерес. Целью настоящего исследования явилась оценка внутрибольничного инфицирования вирусами HGV и TTV и их возможного влияния на частоту и тяжесть поражения печени у детей с острым лимфобластным лейкозом. Основанием для проведения исследования на HGV- и TTV-инфекции среди больных с острым лимфобластным лейкозом было выявление у детей гепатитов неясной этиологии при исключении вирусных гепатитов В и С. Объектами исследования являлись пациенты гематологического отделения и препараты донорской крови, перелитые в период лечения. Было обследовано 99 пациентов, 286 образцов различных препаратов крови. Использовался комплекс методов: эпидемиологические методы исследования (ретроспективный и оперативный эпидемиологический анализ, метод проспективного наблюдения), микробиологический мониторинг, метод иммуноферментного анализа, метод полимеразной цепной реакции, метод вариационной статистики. За 6-летний период наблюдения выявлен 51 ребенок с впервые установленным диагнозом «Острый лимфобластный лейкоз», с преобладанием детей в возрасте от 2-х до 4-х лет (47,1%). При обследовании в динамике в соответствии с установленными периодами, связанными с этапами специфического лечения, количество детей с острым лимфобластным лейкозом, инфицированных HGV, в процессе лечения неуклонно нарастало с 9,8% (15 день лечения) до 45,1% (на этапе поддерживающей терапии). На фоне лечения в 100% случаев отмечалось инфици-

Адрес для переписки:

Сергеева Анжелика Вячеславовна
603950, Россия, Нижний Новгород, пл. Минина
и Пожарского, 10/1, ФГБОУ ВО Приволжский
исследовательский медицинский университет.
Тел.: 8 (903) 060-39-84.
E-mail: sergeeva-av2013@yandex.ru

Contacts:

Anzhelika V. Sergeeva
603950, Nizhny Novgorod, Minin and Pozharsky sq., 10/1,
Privolzhsky Research Medical University.
Phone: +7 (903) 060-39-84.
E-mail: sergeeva-av2013@yandex.ru

Библиографическое описание:

Послова Л.Ю., Алексеев А.Б., Сергеева А.В., Ковалишена О.В., Шкарин В.В., Сенягина Н.Е., Бруснигина Н.Ф., Бутина Т.Ю. Оценка частоты и условий инфицирования вирусами TTV и HGV у детей с впервые установленным острым лимфобластным лейкозом на разных этапах лечения // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 1. С. 147–154. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-147-154

Citation:

Poslova L.Yu., Alekseev A.B., Sergeeva A.V., Kovalishena O.V., Shkarin V.V., Senagina N.E., Brusnigina N.F., Butina T.Yu. Treatment phasespecific frequency and conditions for developing TTV and HGV infection in children with new onset acute lymphoblastic leukemia // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 147–154. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-147-154

рование вирусом TTV изначально ДНК TTV-негативных пациентов, при этом у данной категории детей частота выявления TTV-инфекции в динамике достоверно нарастала. Таким образом, в процессе исследования было установлено, что 48% детей с острым лимфобластным лейкозом были инфицированы HGV и 77% детей инфицированы TTV на начальном этапе лечения (период индукции ремиссии), и в это же время больные получали максимальную парентеральную, в том числе гемотранфузионную терапию. Проведены исследования препаратов донорской крови выявили наличие РНК HGV в $6,6 \pm 1,46\%$, а ДНК TTV — в $19,3 \pm 2,9\%$ случаев.

Ключевые слова: вирусные гепатиты, HGV, TTV, острый лимфобластный лейкоз, посттрансфузионный гепатит, токсическое поражение печени, препараты крови.

TREATMENT PHASE-SPECIFIC FREQUENCY AND CONDITIONS FOR DEVELOPING TTV AND HGV INFECTION IN CHILDREN WITH NEW ONSET ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

Poslova L.Yu.^{a,b}, Alekseev A.B.^b, Sergeeva A.V.^a, Kovalishena O.V.^a, Shkarin V.V.^a, Senagina N.E.^a, Brusnigina N.F.^c, Butina T.Yu.^c

^a Privolzhsky Research Medical University, Ministry of Health Care of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation

^b Nizhny Novgorod Regional Children's Clinical Hospital, Nizhny Novgorod, Russian Federation

^c Nizhny Novgorod Scientific and Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after Academician I.N. Blokhina, Federal Service on Surveillance for Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rospotrebnadzor), Nizhny Novgorod, Russian Federation

Abstract. Currently, it is believed that TTV and HGV display multifaceted activities in developing diverse acute and chronic processes (disorders affecting the liver, respiratory tract, hematopoiesis oncology diseases etc.). Transfusion of contaminated blood and its components contribute in transmission of HGV and TTV infections. In connection with this, examining a role for HGV and TTV in etiological structure of pediatric liver damage in acute lymphoblastic leukemia (ALL) as well as their relation to developing toxic liver damage against during ongoing therapy is of special interest. Our study was aimed at assessing hospital-acquired HGV and TTV infection and its potential effect on the incidence rate and liver damage intensity in children with acute lymphoblastic leukemia. A rationale for the current study was previously verified hepatitis of unknown etiology excluding viral hepatitis B and C in such patients. In the study, there were examined 99 patients stayed at the Department of Hematology as well as 286 samples from diverse donor blood-derived products. The data obtained were examined by using epidemiological methods (retrospective and near real-time epidemiological analysis, prospective observation), microbiological monitoring, ELISA, PCR followed by analyzing with variation statistics methods. It was found that 51 children, mainly aged 2–4 years (47.1%), were diagnosed with new onset acute lymphoblastic leukemia during a six-year follow-up study. Treatment phase-specific dynamic investigation demonstrated a progressive increase in frequency of HGV-infected ALL patients from 9.8% (day 15 of therapy) up to 45.1% (maintenance therapy). Moreover, a therapeutic intervention was associated with TTV infection detected in 100% cases in baseline TTV DNA-negative patients 100%, and its rate was significantly increased. Thus, our study allowed to demonstrate that 48% and 77% ALL pediatric patients were infected HGV and TTV, respectively, at initial treatment phase (remission induction), that was paralleled with administering the maximum-dose parenteral therapy, including transfusion therapy. Finally, assessing blood donor-derived preparations allowed to detect HGV RNA and TTV DNA in $6.6 \pm 1.46\%$ and $19.3 \pm 2.9\%$ cases, respectively.

Key words: viral hepatitis, HGV, TTV, acute lymphoblastic leukemia, posttransfusional hepatitis, post-transfusion hepatitis, toxic liver damage, blood products.

Введение

Многими исследователями установлено, что вирус гепатита G (HGV) и вирус TTV (передающийся при переливании «transfusion transmitted virus») связаны с возникновением инфекций с парентеральной передачей возбудителя [2, 4, 5, 11, 12, 14].

Частота обнаружения РНК HGV в популяции в среднем составляет 1,7% [5]. Частота регистрации посттрансфузионного G-гепатита невелика — 4%. В России среди доноров крови

РНК HGV выявлялась в 2–11%, также вирусы обнаруживали в факторе VIII и IX, анти-D иммуноглобулине и иммуноглобулине для внутривенного введения. Было установлено более частое выявление HGV среди доноров плазмы для плазмафереза (от 24 до 57%). Среди доноров крови анти-E2 определялись в 2–3 раза чаще, чем РНК HGV [7].

TTV широко распространены в человеческой популяции (до 95%) и с высокой частотой обнаруживаются в сыворотке крови и различных секретах у людей [4, 5, 8, 11]. В России

у доноров крови 8 различных городов выявляли ДНК TTV до 45–55% [5]. Результаты многочисленных исследований позволяют считать, что TTV передается при трансфузиях крови, ее компонентов и трансплантации органов [13]. Это доказывается выявлением ДНК TTV в коммерческих препаратах крови, в концентратах, содержащих факторы свертывания крови, в иммуноглобулинах для парентерального применения [12]; подтверждается идентификацией TTV у реципиентов крови. Определена строгая зависимость между количеством гемотрансфузий и наличием TTV. Было показано, что TTV-инфекция статистически чаще регистрируется среди пациентов, которым ранее производились переливания крови (26,4%), по сравнению с теми, кто не получал гемотрансфузии (4,7%) [10]. ДНК TTV выявляется среди больных гемофилией от 32 до 75%, В-талассемией — до 93,5% [13]. Таким образом, распространению HGV- и TTV-инфекций способствует использование инфицированной крови и ее продуктов [2].

Исследователи полагают о многогранной потенции TTV в формировании различных острых и хронических процессов (заболеваний печени, дыхательных путей, онкологических, болезней крови, гематологических нарушений и др.) [3, 6, 8, 9, 11]. В исследованиях получены данные о вероятной связи вируса TTV с заболеваниями системы кроветворения (апластическая анемия, острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) и др.) [1]. В специальном исследовании показано, что у здоровых детей частота идентификации TTV составила 94,1% (77% составили дети раннего возраста — до 1,5 лет), у больных гепатитом неустановленной этиологии — 82,5% (88% школьников), у больных ХГВ и С — 100% (дети в возрасте 4–16 лет составили 66%). Таким образом, у детей по существу обнаружена персистенция анелловирусов, поэтому дискутируется вопрос о роли TTV-инфекции в формировании различной патологии, в том числе печени [4].

Работы по изучению HGV- и TTV-инфекций у пациентов с тяжелыми гематологическими заболеваниями малочисленны. Данные контингенты больных в процессе лечения получают большую парентеральную нагрузку. Поэтому, очевидна необходимость изучения проблемы HGV- и TTV-гепатитов как внутрибольничных инфекций, проведения исследований для определения путей передачи вирусов HGV и TTV, в том числе у детей с ОЛЛ.

Целью исследования являлась оценка частоты и условий инфицирования вирусами HGV и TTV у детей с впервые установленным ОЛЛ на разных этапах лечения с позиций риска внутрибольничного инфицирования и реализации парентерального пути передачи.

Задачи исследования:

1. Определить частоту выявления ДНК TTV и РНК HGV в крови у детей с ОЛЛ в детском гематологическом отделении на разных этапах лечения;
2. Изучить значимость парентерального пути передачи TTV- и HGV-инфекции у детей с ОЛЛ на этапах лечения.

Материалы и методы

Основанием для проведения исследования на HGV- и TTV-инфекции среди больных с ОЛЛ было выявление у данной категории пациентов гепатитов неясной этиологии при исключении вирусных гепатитов В и С. Объектами исследования являлись пациенты гематологического отделения с впервые установленным диагнозом ОЛЛ (51 ребенок в возрасте от 1 года до 16 лет) и препараты донорской крови, перелитые в период лечения (286 проб).

По возрастно-половому составу наблюдаемых детей с ОЛЛ было примерно одинаковое количество девочек (53%) и мальчиков (47%); преобладали дети в возрасте от 2 до 4 лет — 47,1%, пациенты до 2 лет, 5–9 лет, 10–13 лет, 14 лет и старше составили, соответственно, 15,7; 13,7; 9,8 и 13,7%, что соответствует данным литературы о возрастных особенностях заболеваемости ОЛЛ среди детей.

Использовался комплекс методов исследования: описательно-оценочные, эпидемиологические (ретроспективный и оперативный эпидемиологический анализ, метод проспективного наблюдения), микробиологические методы (иммуноферментный анализ (ИФА), полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени, биохимические методы, статистические методы (методы вариационной статистики).

Обследование детей с ОЛЛ проводилось в соответствии со стандартами медицинской помощи при данном заболевании. Диагноз ОЛЛ устанавливался на основании клинических и лабораторных данных согласно классификации ВОЗ от 1999 г. Для решения поставленных задач данного исследования пациенты наблюдались в различные фазы лечения ОЛЛ по протоколу ALL-MB-2002/2008.

Комплексное исследование было организовано по типу наблюдательного, проспективного, сплошного клинического исследования.

1) Мониторинг маркеров вирусных гепатитов В, С и HGV, TTV — всем пациентам определялись: анти/HCV и HBsAg (методом ИФА); вирусы HCV, HBV и TTV, HGV (методом ПЦР) в определенные сроки:

а) при первичной госпитализации и впервые диагностированном ОЛЛ (до начала программ-

ной терапии лейкоза, до первого переливания компонентов крови, до начала инфузионной терапии);

б) в динамике на разных этапах лечения — в сроки, соответствующие основным этапам протоколов MB-ALL-2002/2008:

- на 15 день от начала лечения — этапа индукции ремиссии;
- на 36 день этапа индукции ремиссии;
- на 7–14 неделях (1,5–3,5 месяца) лечения — этап консолидация I;
- на 15–22 неделях (5–6 месяцев) — этап консолидация II;
- на 23–30 неделях (7–8 месяцев) — этап консолидация III;
- на 31–104 неделях (8–24 месяцев) — этап поддерживающей терапии.

РНК HGV, РНК HCV и ДНК TTV в сыворотке крови определялись методом ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с детекцией продуктов ПЦР в реальном времени с использованием тест-систем «АмплиСенс® HGV-ERh», «АмплиСенс® HCV-1/2/3» (ФГУН ЦНИИЭ, Москва), набор «ПОЛИГЕП TTV-КТ» (ООО НПФ «Литех», Москва). Определение

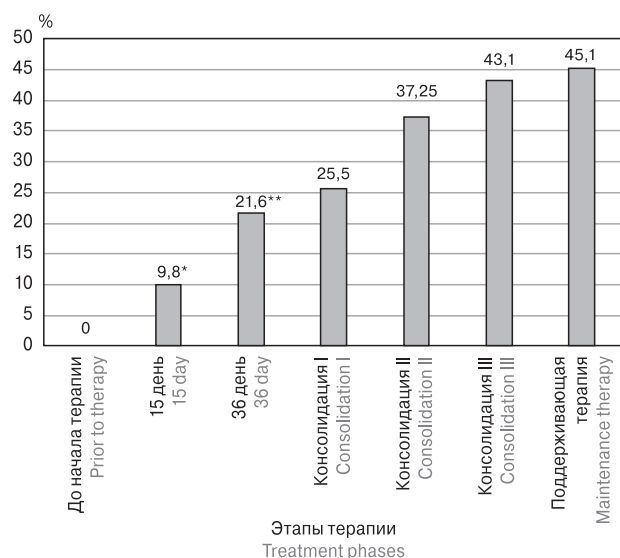


Рисунок 1. Частота выявления РНК HGV среди детей с ОЛЛ на различных этапах лечения на 100 обследованных детей: нарастающий итог

Figure 1. Treatment phase-dependent frequency of HGV RNA detection in pediatric ALL patients (per 100 pediatric ALL patients): a progressive total

Примечания. * — достоверность различий с предыдущими показателями, $p = 0,025$;

** — достоверность различий с предыдущими показателями, $p = 0,006$.

Notes. * — significant difference between preceding vs. subsequent time points, $p = 0.025$; ** — significant difference between preceding vs. subsequent time points, $p = 0.006$.

маркеров вирусных гепатитов В и С проводилось методом ИФА с использованием тест-систем производства НПО «Диагностические системы» (Нижний Новгород).

2) Создавался банк донорской крови: после переливания препаратов крови пациентам, включенным в исследование, проводился отбор донорской крови (в количестве 1 мл) — при каждой гемотрансфузии (в пробирки «эппендорф»), которые хранились в условиях морозильной камеры (DERBY D-LT при температуре -40°C). Пробы донорской крови от каждого конкретного пациента отбирались в период с начала первой гемотрансфузии и до получения положительного результата на HGV или TTV.

Статистическую обработку результатов проводили при помощи программы STATISTICA ver. 10. Для средних величин рассчитано стандартное отклонение; оценку средней и ее точность проводили с помощью 95% доверительного интервала (ДИ).

Результаты

По результатам обследования детей с впервые установленным ОЛЛ маркеры вирусных гепатитов В и С (HBsAg, анти-HCV — в ИФА, РНК HCV и ДНК HBV — методом ПЦР) не были выявлены ни у одного из наблюдаемых пациентов на всех этапах (при первичной госпитализации и на последующих этапах лечения). Также при первичном обследовании больных с ОЛЛ установлено, что на момент поступления в стационар РНК HGV в крови не выявлена ни у одного пациента. Однако при обследовании в динамике в соответствии с установленными периодами, связанными с этапами специфического лечения, количество детей с ОЛЛ, инфицированных HGV, в процессе лечения неуклонно нарастало. Так, на 15 день от начала лечения (этап индукции ремиссии) РНК HGV выявлена у 5 пациентов из 51 (9,8% [95% ДИ: 5,6–14,0]), что достоверно чаще, чем при первичном обследовании ($p = 0,025$). На 36 день этапа индукции ремиссии РНК HGV обнаружена у 11 пациентов из 51 (21,6% [95% ДИ: 15,8–27,4]), что также достоверно чаще, чем при предыдущем обследовании ($p = 0,006$). На этапах консолидации I, II, III и на этапе поддерживающей терапии также отмечался рост показателей без достоверных отличий (рис. 1).

Таким образом, 45,1% детей с ОЛЛ инфицировались HGV внутрибольнично — во время нахождения в стационаре и получения различных лечебно-диагностических манипуляций, причем 60% из них — в первые 3 месяца лечения (2 этапа индукции ремиссии и этап консолидации I) во время максимальных парентеральных нагрузок (рис. 1).

При мониторинге наличия HGV-виремии среди наблюдаемых детей установлено, что РНК HGV в крови после первичного выявления продолжала стойко выявляться у всех инфицированных пациентов.

По результатам проведенного лабораторного обследования в зависимости от отсутствия или наличия РНК HGV в крови пациенты были разделены на 2 группы: 1 группа — не инфицированные HGV исходно до начала терапии и не инфицированные HGV на этапах лечения — 28 детей (55%); 2 группа — не инфицированные HGV исходно до начала терапии и инфицированные HGV в дальнейшем на разных этапах лечения — 23 ребенка (45%).

В ходе изучения частоты выявления ТТV-инфицирования у детей с впервые установленным ОЛЛ было определено, что на момент поступления в стационар ДНК ТТV в крови выявлена у 74,5% обследованных пациентов ($n = 38$), и ТТV-виремия стойко сохранялась на протяжении всего периода наблюдения. Установлено, что в ходе лечения инфицированность возрастала и по итогу в 100% случаев отмечалось инфицирование вирусом ТТV изначально ДНК ТТV-негативных пациентов. Так, до начала лечения ДНК ТТV в крови выявлена у 74,5% [95% ДИ: 68,4–80,6] (38 из 51) человек ($p_{1-3} = 0,009$), на 15-й день лечения — у 88,2% [95% ДИ: 83,68–92,7] (45 из 51) детей, на 36-й день лечения у 94,1% [95% ДИ: 90,8–97,4] (48 из 51) на этапе консолидации I — в 98,0% [95% ДИ: 96,0–100,0] (50 из 51) случаев ($p_{1-4} = 0,001$). На этапах консолидаций II, III и поддерживающей терапии ДНК ТТV в крови была выявлена у всех (100%) детей (рис. 2).

Таким образом, среди детей, страдающих ОЛЛ, большинство (74,5% [95% ДИ: 68,4–80,6]) инфицированы вирусом ТТV уже до начала терапии. В процессе проводимой терапии вирусом ТТV инфицируется внутрибольнично 100% изначально неинфицированных детей с ОЛЛ, что составляет 25,5% всех пациентов с впервые установленным ОЛЛ. Из инфицированных после начала лечения в 77% [95% ДИ: 71,1–82,9] случаев заражение происходило на ранних этапах лечения (индукции ремиссии).

В результате сравнительного анализа было показано, что инфицирование HGV происходило в 1,8 раз чаще, чем инфицирование ТТV (45,1% против 25,5%) на фоне высокого процента инфицирования ТТV (74,5%) до начала лечения.

Трансфузионная терапия является важнейшей составной частью сопроводительной терапии ОЛЛ, позволяющей избежать тяжелых осложнений, в том числе угнетения костномозгового кроветворения. Анализ гемотрансфузионной терапии у детей с ОЛЛ показал, что трансфузии клеточных (эритроцитарные сре-

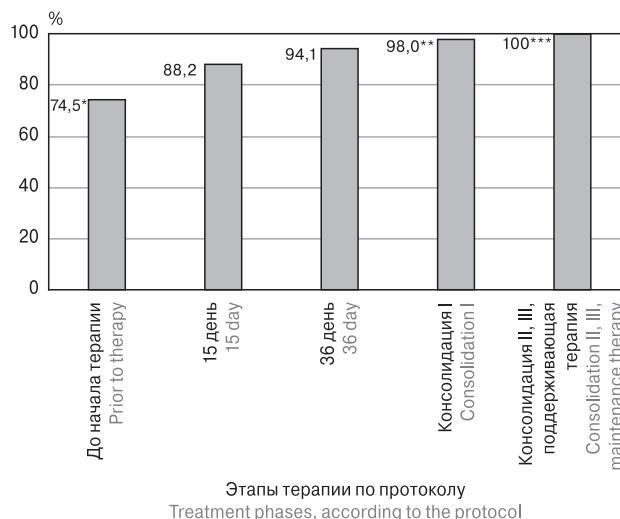


Рисунок 2. Частота выявления ДНК ТТV среди детей с ОЛЛ на разных этапах лечения (%): нарастающий итог

Figure 2. Treatment phase-dependent frequency of TTV DNA detection in pediatric ALL patients (percentage): a progressive total

Примечания. * — достоверность различий между этапами, $p(1) - (3) = 0,009$; ** — достоверность различий между группами, $p(1) - (4) = 0,001$; *** — достоверность различий между группами, $p(1) - (5) = 0,0002$.

Notes. * — significant difference between treatment phases, $p(1) - (3) = 0.009$; ** — significant difference between groups, $p(1) - (4) = 0.001$; *** — significant difference between groups, $p(1) - (5) = 0.0002$.

ды — отмытые, размороженные, фильтрованные; тромбоцитная масса — нативная, размороженная, фильтрованная) и бесклеточных (свежезамороженная плазма, альбумин) компонентов и препаратов крови проводились у каждого из 51 наблюдаемого ребенка (100%) в различные сроки лечения. При этом лейкоцитная масса не переливалась ни одному больному. На начальном этапе лечения (индукции ремиссии) проводилось максимальное количество гемотрансфузий как эритроцитарных сред (89%), так и тромбоцитной массы (98,3%). В то же время среди всех гемотрансфузий переливания тромбоцитной массы составили 83%, что 5,7 раз больше по количеству перелитых доз на 1 больного по сравнению с эритроцитарными средами. Таким образом, основным гемотрансфузионным препаратом являлась тромбоцитная масса (рис. 3).

На начальном этапе лечения (индукции ремиссии) также проводилось максимальное количество трансфузий как свежемороженой плазмы (96,8%), так и альбумина (71,4%).

Таким образом, при анализе гемотрансфузионной терапии отмечено, что максимальное количество трансфузий клеточных и бесклеточных компонентов крови осуществлялось на начальном этапе лечения (индукции ре-

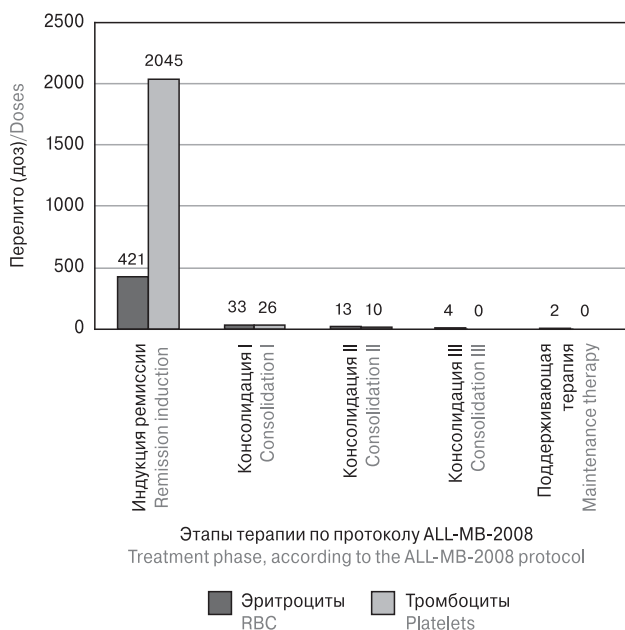


Рисунок 3. Динамика трансфузий клеточных компонентов крови (эритроцитов и тромбоцитов) на разных этапах терапии ОЛЛ (в абсолютных цифрах)

Figure 3. Treatment phase-dependent transfusion of cellular blood components (erythrocytes and platelets) in pediatric ALL patients (absolute numbers)

миссии). Начиная с этапа консолидации I и II, трансфузионная нагрузка значительно снижалась, на этапах консолидации III и поддерживающей терапии эпизоды трансфузий являлись единичными и касались только эритроцитарных сред.

Таблица. Сведения об инфицировании пациентов с ОЛЛ в период лечения и препаратах донорской крови

Table. Treatment phase-related rate of HGV and TTV detection in ALL patients and donor blood-derived preparations

№ пациента Patient number	Инфицирование в период лечения Infection during treatment period	Количество перелитых препаратов крови Number of blood products transfused	Инфицировано препаратов крови (при выборочном исследовании) Number of infected blood products (randomly selected)		
			HGV	TTV	HGV + TTV
1	HGV	63	5	–	
2	HGV	53	2	1	
3	HGV	59	1	2	
4	HGV+TTV	126	4	11	1
5	HGV+TTV	25	–	4	
6	HGV	50	2	4	
7	HGV+TTV	94	2	11	1
8	HGV+TTV	30	1	–	
9	HGV+TTV	15	–	1	
Всего/Total			17	34	2

Был проведен анализ частоты инфицирования больных с ОЛЛ вирусами HGV и TTV в сопоставлении с гемотрансфузионной нагрузкой. Учитывая, что наибольшее число детей с ОЛЛ были инфицированы на начальном этапе лечения — в период индукции ремиссии (48% детей были инфицированы HGV и 77% детей — TTV), когда пациенты получали максимальную парентеральную, в том числе гемотрансфузионную терапию, гемотрансфузии могут быть факторами передачи вирусов HGV и TTV.

В соответствии с задачами исследования осуществляли отбор проб препаратов донорской крови и проводили выборочные лабораторные исследования донорских препаратов (на наличие РНК HGV и ДНК TTV методом ПЦР), перелитых ранее не инфицированным пациентам с ОЛЛ, у которых в последующем были выявлены TTV и HGV.

Получены следующие результаты: из исследованных 286 проб РНК HGV определена в 19 (6,6±1,46%); из 187 проб ДНК TTV установлена в 36 (19,3±2,9%); в двух пробах выявлены HGV + TTV (0,4%). Более подробные данные представлены в таблице 1.

Таким образом, в результате выборочных исследований препаратов донорской крови было выявлено 9 больных с ОЛЛ, инфицированных в период лечения вирусами HGV и TTV, когда пациентам было перелито от 1 до 11 доз препаратов, содержащих вирусы. Данные результаты подтверждают факт внутрибольничного инфицирования вирусами HGV и TTV парентеральным (гемотрансфузионным) путем.

Учитывая, что каждый ребенок с ОЛЛ в процессе лечения болезни на фоне большой парентеральной нагрузки получает от нескольких десятков до сотен доз препаратов донорской крови, в том числе содержащих HGV и TTV, необходимо изучать вопрос о тестировании донорских препаратов на вирусы.

В результате проведенного исследования проведена комплексная оценка внутрибольничного инфицирования вирусами HGV и TTV и их возможное влияние на частоту и тяжесть поражения печени у детей с острым лимфобластным лейкозом. Установлено, что у 51 ребенка был зарегистрирован диагноз ОЛЛ. Группой риска были дети в возрасте от 2 до 4 лет (47,1%). При обследовании в динамике в соответствии с установленными периодами, связанными с этапами специфического лечения, количество детей с ОЛЛ, инфицированных HGV, в процессе лечения неуклонно нарастало с 9,8% (15 день лечения) до 45,1% (на этапе поддерживающей терапии). На фоне лечения в 100% случаев отмечалось инфицирование вирусом TTV изначально ДНК TTV-негативных пациентов, при этом у данной категории детей частота выявления TTV-инфекции в динамике достоверно нарастала.

Таким образом, в процессе исследования было установлено, что 48% детей с острым лимфобластным лейкозом были инфицированы HGV и 77% детей инфицированы TTV на начальном этапе лечения (период индукции ремиссии), и в это же время больные получали максимальную парентеральную, в том числе гемотрансфузионную, терапию. Проведены исследования препаратов донорской крови выявили наличие РНК HGV в $6,6 \pm 1,46\%$, а ДНК TTV — в $19,3 \pm 2,9\%$ случаев.

Выводы

1. Дети с ОЛЛ были инфицированы HGV (48%) и TTV (77%).
2. В процессе терапии ОЛЛ каждый ребенок был инфицирован TTV и каждый второй ребенок — HGV.
3. Трансфузии компонентов крови являются факторами инфицирования вирусами TTV и HGV.
4. Введение тестирования препаратов донорской крови на наличие вирусов HGV и TTV является необходимым элементом в системе эпидемиологического надзора за парентеральными гепатитами.

Список литературы/References

1. Горелов А.В., Милутина Л.Н., Рейзис А.Р., Усенко Д.В., Никитина Т.С., Дрондина А.К. Итоги и перспективы изучения проблемы острых кишечных, респираторных инфекций и гепатитов у детей // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2009. № 2. С. 51–57. [Gorelov A.V., Milyutina L.N., Reizis A.R., Usenko D.V., Nikitina T.S., Drondina A.K., Ploskireva A.A., Ruzhentsova T.A. The results and prospects of a study of acute enteric and respiratory infections and hepatitis in children. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2009, no. 2, pp. 51–57. (In Russ.)]
2. Громова Н.И., Гордейчук И.В., Кюрегян К.К., Ильченко Л.Ю., Михайлов М.И. Клиническая значимость выявления РНК HGV у больных хроническими вирусными гепатитами // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2012. № 2. С. 35–40. [Gromova N.I., Gordeychuk I.V., Kyuregyan K.K., Ilchenko L.U., Mikhailov M.I. The clinical significance of detection of RNA in patients with chronic viral hepatitis. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2012, no. 2, pp. 35–40. (In Russ.)]
3. Румянцева Ю.В., Карачунский А.И., Румянцев А.Г. Оптимизация терапии острого лимфобластного лейкоза у детей в России. Педиатрия. 2009. № 4. С. 20–27. [Rumyantseva Yu.V., Karachunsky A.I., Rumyantsev A.G. Optimization of acute lymphoblastic leukemia therapy in children in Russia. *Pediatriya = Pediatrics*, 2009, no. 4, pp. 20–27. (In Russ.)]
4. Учайкин В.Ф., Чередниченко Т.В., Самохвалов Е.И., Филиппова Е.В., Чаплыгина Г.В., Ковалев О.Б., Конев В.А. Современные представления о ТТ-вирусной инфекции у детей // Детские инфекции. 2010. № 4. С. 15–18. [Uchaykin V.F., Cherednichenko T.V., Samokhvalov E.I., Filipova E.V., Chaplygina U.V., Kovalev O.B., Konev V.A. Present-day understanding of TT-virus infection in children. *Detskie infektsii = Children's Infections*. 2010, no. 4, pp. 15–18. (In Russ.)]
5. Шахгильдян И.В., Михайлов М.И., Онищенко Г.Г. Парентеральные вирусные гепатиты (эпидемиология, диагностика, профилактика). М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2003. 384 с. [Shakhgildyan I.V., Mikhailov M.I., Onishchenko G.G. Parenteral viral hepatitis (epidemiology, diagnosis, prevention). Moscow: GOU VUNMTS MH RF, 2003. 384 p. (In Russ.)]
6. Andreoli E. Small anellovirus in hepatitis C patients and healthy controls. *Emerg. Infect. Dis.*, 2006, vol. 12, pp. 1175–1176. doi: 10.3201/eid1207.060234
7. Hwang S.J., Lu R.H., Chan C.Y., Chang F.Y., Lee S.D. Detection of antibodies to E2-protein of GB virus-C/hepatitis G virus in patients with acute posttransfusion hepatitis. *J. Med. Virol.*, 1999, vol. 57, № 1, pp. 85–89.
8. Hino S., Miyata H. Torque teno virus (TTV): current status. *Rev. Med. Virol.*, 2007, vol. 17, pp. 45–47. doi: 10.1002/rmv.524
9. Kakkola L. Replication of and protein synthesis by TT viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2009, vol. 331, pp. 53–64.
10. Mushahwar I.K., Erker J.C., Muerhoff A.S. Molecular and biophysical characterization of TT virus: evidence for a new virus family infecting humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, vol. 96, pp. 3177–3182.
11. Okamoto H. History of discoveries and pathogenicity of TT viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2009, vol. 331, pp. 1–20.
12. Pizani G. Prevalence of TT virus in plasma pools and blood products. *Br. J. Haematol.*, 1999, vol. 106, pp. 431–435.

13. Takayama S., Miura T., Matsuo S. Prevalence and persistence of a novel DNA TT virus (TTV) infection in Japanese haemophilians. *Br. J. Haematol.*, 1999, vol. 104, pp. 626–629.
14. Zur Hausen H., Villiers E.M. TT viruses: oncogenic or tumor-suppressive properties. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2009, vol. 331, pp. 109–116.

Авторы:

Послова Л.Ю., к.м.н., ассистент кафедры эпидемиологии ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия; зав. эпидемиологическим отделом ГБУЗ НО Нижегородская областная детская клиническая больница, Нижний Новгород, Россия;

Алексеев А.Б., врач-гематолог ГБУЗ НО Нижегородская областная детская клиническая больница, Нижний Новгород, Россия;

Сергеева А.В., к.м.н., доцент кафедры эпидемиологии, зав. проблемной научной лаборатории ПЦР-исследований НИИ профилактической медицины ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет МЗ РФ, Нижний Новгород, Россия;

Ковалишена О.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой эпидемиологии, зам. директора по науке НИИ профилактической медицины ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет МЗ РФ, Нижний Новгород, Россия;

Шкарин В.В., д.м.н., профессор кафедры эпидемиологии ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет МЗ РФ, Нижний Новгород, Россия;

Сенягина Н.Е., к.м.н., доцент кафедры детских инфекций ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет МЗ РФ, Нижний Новгород, Россия;

Бруснигина Н.Ф., к.м.н., доцент, зав. лабораторией метагеномики и молекулярной индикации патогенов ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия;

Бутина Т.Ю., врач клинической лабораторной диагностики Приволжского окружного центра по профилактике и борьбе со СПИД ФБУН Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия.

Authors:

Poslova L.Yu., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Epidemiology, Privolzhsky Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation; Head of the Epidemiology Department, Nizhny Novgorod Regional Children's Clinical Hospital, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Alekseev A.B., Haematologist, Nizhny Novgorod Regional Children's Clinical Hospital, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Sergeeva A.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Epidemiology, Head of the PCR Research Laboratory, Institute of Preventive Medicine, Privolzhsky Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Kovalishena O.V., PhD, MD (Medicine), Professor; Head of the Department of Epidemiology, Deputy Director for Science, Institute of Preventive Medicine of the Privolzhsky Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Shkarin V.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Epidemiology, Privolzhsky Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Senagina N.E., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Childhood Infections, Privolzhsky Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Brunnigina N.F., PhD (Medicine), Associate Professor, Head of the Laboratory of Metagenomics and Molecular Pathogen Diagnostics, Nizhny Novgorod Scientific and Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after academician I.N. Blokhina, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Butina T.Yu., Clinical Laboratory Diagnostics Specialist, Volga District Center for AIDS Prevention and Control, Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after Academician I. N. Blokhina, Nizhny Novgorod, Russian Federation.

Поступила в редакцию 17.04.2018
Отправлена на доработку 04.03.2019
Принята к печати 11.03.2019

Received 17.04.2018
Revision received 04.03.2019
Accepted 11.03.2019

КРОВЕПАРАЗИТАРНАЯ ИНФЕКЦИЯ КАК ПРИЧИНА ВОЗНИКНОВЕНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ И ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ ОБРАЗОВАНИЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА

А.В. Терлецкий, Л.Г. Ахмерова, Е.В. Евтушенко

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск, Россия

Резюме. Исследования архивного цитологического материала, полученного врачами-цитологами за ряд лет в ходе выполнения тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии при аутоиммунном тиреоидите и доброкачественных образованиях щитовидной железы человека (киста и зоб), позволили обнаружить одновременное присутствие в разных сочетаниях патоморфологических признаков обоих состояний в препаратах долей щитовидной железы. В этой связи возник вопрос о возможной общей этиологии вышеуказанных процессов. Исследованиями цитологического материала при аутоиммунном тиреоидите и доброкачественных образований щитовидной железы человека (киста и зоб), окрашенных изначально в медицинских лабораториях по Романовскому–Гимзе, выявлена гемоспоридийная (кровепаразитарная) инфекция. В процессе длительного детального изучения мазков с цитологическим материалом удалось проследить эволюцию развития гемоспоридий в тироцитах щитовидной железы. Для уточнения локализации ДНК тироцитов и гемоспоридийной инфекции после изучения всего массива мазков было решено окрасить (переокрасить) выборочный ряд оригинальных архивных мазков реактивом Шиффа по Фельгену. Метод окрашивания мазков по Романовскому–Гимзе является адсорбционным, что позволило повторно использовать эти же мазки для окраски реактивом Шиффа по Фельгену, где краситель фуксин после гидролиза ДНК соляной кислотой встраивается в ДНК и окрашивает ее в малиново-сиреневый цвет. Окрашивание ДНК по Фельгену позволило в «медузоподобных» структурах из содержимого кист, являющихся, по всей вероятности, экзоэритроцитарной стадией развития гемоспоридий, локализовать находящуюся в них и некоторых эритроцитах паразитарную ДНК. При аутоиммунном тиреоидите удалось локализовать ядерную ДНК тироцитов и паразитарную ДНК в виде точечных включений и диффузно распределенной в цитоплазме тироцитов, а также ДНК в эритроцитах крови в виде ядер разных размеров, окрашенных в малиново-сиреневый цвет. При узловом зобе удалось локализовать ядерную ДНК тироцитов, и ДНК гемоспоридий в виде точечных включений и диффузно распределенной в цитоплазме тироцитов. ДНК гемоспоридий в эритроцитах крови проявилась в виде ядер разных размеров, окрашенных в малиново-сиреневый цвет, неокрашенная протоплазма кровепаразитарной инфекции выявлялась в виде светлой полосы вокруг ядер в эритроцитах. Ядерный материал гемоспоридий в эритроцитах был раз-

Адрес для переписки:

Терлецкий Александр Витальевич
630090, Россия, г. Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 8/2,
Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН.
Тел.: 8 (383) 363-90-42 (служебн.); 8 952 905-03-28,
8 913 717-99-42 (моб.). Факс: 8 (383) 363-90-78.
E-mail: terletsky@mcb.nsc.ru; terletsky_1@mail.ru

Contacts:

Alexander V. Terletsky
630090, Russian Federation, Novosibirsk, Acad. Lavrentieva pr., 8/2,
Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS.
Phone: +7 (383) 363-90-42 (служебн.); +7 952 905-03-28,
+7 913 717-99-42 (моб.). Fax: +7 (383) 363-90-78.
E-mail: terletsky@mcb.nsc.ru; terletsky_1@mail.ru

Библиографическое описание:

Терлецкий А.В., Ахмерова Л.Г., Евтушенко Е.В. Кровепаразитарная инфекция как причина возникновения воспалительных реакций и доброкачественных образований щитовидной железы человека // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 1. С. 155–161. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-155-161

Citation:

Terletsky A.V., Akhmerova L.G., Evtushenko E.V. Blood parasite infection causing inflammatory reactions and benign formations in human thyroid gland // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 155–161. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-155-161

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных научных исследований по теме 0310–2019–0003.

ных размеров, что может свидетельствовать о разных видах и/или генерациях возбудителя. Внутриклеточное развитие гемоспоридийной инфекции при зобе в тироцитах приводит к выраженной гиперплазии цитоплазмы и ее вакуолизации, ядра тироцитов при этом деформируются, вакуолизируются, уменьшаются в размерах и деградируют (с высокой вероятностью мутаций и делеций в ДНК), достигая преднеопластического уровня.

Ключевые слова: киста щитовидной железы, аутоиммунный тиреоидит, узловой зоб, кровепаразитарная (гемоспоридийная) инфекция.

BLOOD PARASITE INFECTION CAUSING INFLAMMATORY REACTIONS AND BENIGN FORMATIONS IN HUMAN THYROID GLAND

Terletsky A.V., Akhmerova L.G., Evtushenko E.V.

Institute of Molecular and Cellular Biology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. A retrospective examining of cytology specimens obtained and verified by a fine-needle aspiration biopsy from patients with autoimmune thyroiditis and benign thyroid gland (cyst and goiter) formations allowed to note that in thyroid lobes they coincided in various combinations, thus rising a question about their potential etiological relation. In particular, a hemosporidian (blood parasitic) infection was found while analyzing cytology specimens from patients with autoimmune thyroiditis and benign thyroid gland (cyst and goiter) tumors pre-stained by Romanowsky–Giemsa dye. An evolution of developing intra-thyocyte hemosporidia was tracked during a long-term detailed analysis of cytology specimens noted above. A panel of select specimens was stained (re-stained) with Schiff reagent according to the Feulgen method to clarify position of thyrocyte DNA and hemosporidian pathogens. Owing to an absorption approach, Romanowsky–Giemsa method allowed to repeatedly use specimens pre-stained with Schiff reagent according to the Feulgen method, wherein fuchsin was incorporated into DNA molecules after they were hydrolyzed by hydrochloric acid to stain specimens into magenta-lilac color. It allowed to identify a parasitic DNA inside developing hemosporidia most probably at exoerythrocytic stage and some erythrocytes cyst-based medusiform structures. Such technique used to stain specimens from patients with autoimmune thyroiditis allowed to localize the thyrocyte nuclear DNA as well as punctate and diffuse cytoplasmic inclusions of parasitic DNA, including magenta-lilac nuclei of different sizes inside erythrocytes. Thyrocyte nuclear DNA as well as punctate and diffuse hemosporidian DNA were distinguished in nodular goiter. Moreover, hemosporidian DNA was identified in a form of magenta-lilac multi-size nuclei inside erythrocytes. In contrast, unstained hemosporidian protoplasm was revealed as light-colored band around erythrocyte nuclei. The intra-erythrocyte nuclear hemosporidian material of different sizes may evidence about various species and/or pathogen generations. Intra-thyrocyte development of hemosporidian infection in patients with goiter results in marked cytoplasmic hyperplasia and its vacuolization associated with thyrocyte nuclear deformation, vacuolization, decreased size and degradation (with highly probability of mutations and deletions), reaching a pre-neoplastic level.

Key words: autoimmune thyroiditis, cyst, nodular goiter, hemosporidian infection.

Введение

Существуют разные предположения о причинах доброкачественных и злокачественных заболеваний щитовидной железы, однако до сих пор этиология остается невыясненной [12].

Настораживающими моментами для нас при исследовании документированного врачами-цитологами архивного цитологического материала явились описания к мазкам с одновременным присутствием в долях щитовидной железы в разных сочетаниях аутоиммунного тиреоидита, кисты, узлового зоба, а также фолликулярного, папиллярного и медулярного раков. Невольно возник вопрос об их возможной этиологической взаимосвязи, как о «звеньях одной цепи». На первом этапе исследования мы изучали только мазки с воспалительными и доброкачественными образованиями в щитовидной железе.

Ранее было показано, что в цитологических мазках после тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии (ТАПБ) щитовидной железы в фолликулярном эпителии при неопухольевых процессах выявляли пигментированные тироциты, цитоплазма которых содержала мелкую пигментную зернистость (липофусцин, гемосидерин) [2]. Причина появления и нахождения пигментной зернистости в тироцитах, к сожалению, не была объяснена. При этом объективно видимые включения в эритроцитах крови, попадающих при ТАПБ в мазок, врачи-цитологи воспринимали как дефекты окрашивания мазков.

Данная информация послужила основанием провести на первом этапе наших исследований ретроспективное сравнительное микроскопическое исследование цитологического материала с конкретными диагнозами за 2007–2014 гг. (аутоиммунный тиреоидит, киста щитовидной

железы в сравнении с узловым зобом) с целью выяснения причины данных явлений.

По нашему предположению такое появление внутриклеточных пигментов крови в тироцитах могло быть следствием гемоспоридийной инфекции крови — ее шизогональной стадии.

Было отмечено, что в теле мерозоитов *Babesia caballi* депонируется белок гемоглобин, который используется, вероятнее всего, для питания в период нахождения паразита в плазме крови [25]. Не исключается присутствие гемоглобина в теле мерозоида и после внедрения в клетки паренхиматозных органов.

Рутинное цитологическое исследование после ТАПБ проводят при 400-кратном увеличении (ок. 10, об. 40) и основное внимание обращают на структурные изменения клеточного состава в ткани щитовидной железы, что является основным в интерпретации и постановке диагноза. Для выявления внутриклеточных структур такого увеличения недостаточно.

Материалы и методы

В данном цитологическом исследовании мазков ТАПБ щитовидной железы был изучен материал, полученный от 5 человек с диагнозом «Киста», от 30 человек с аутоиммунным тиреоидитом (АИТ) и от 375 человек с узловым зобом (УЗ). Весь цитологический материал, подлежащий исследованию, изначально в условиях медицинских лабораторий был окрашен по Романовскому–Гимзе.

Исследования мазков проводили на микроскопе Axiostar plus (Carl Zeiss) с иммерсией при увеличении микроскопа 1000 (Окуляр PL $\times 10/18 \infty$, объектив CP-ACHROMAT $\times 100/1.25 \text{ oil}, \infty/0.17$). Фотографии делали камерой Olympus SP-310. Основное внимание обращали на внутриклеточные структуры в тироцитах и клетках крови.

Для уточнения локализации ДНК в тироцитах после изучения всего массива мазков было решено окрасить ряд оригинальных архивных мазков после ТАПБ реактивом Шиффа по Фельгену. Реактив Шиффа — фуксинсернистая кислота — является характерным реактивом на альдегиды. На свойстве реактива Шиффа взаимодействовать с альдегидными группами основана реакция Фельгена. В молекуле ДНК альдегидные группы связаны, их необходимо предварительно освободить. При слабом кислотном гидролизе нуклеиновых кислот (вследствие отщепления пуринов и пиримидинов от дезоксирибозофосфата) появляются свободные альдегидные группы, образующие ярко окрашенный комплекс при взаимодействии с фуксином (реакция Фельгена). Реактив Шиффа окрашивает только ядра и хромосомы

в красновато-фиолетовый цвет, цитоплазма остается совершенно неокрашенной. Реакция Фельгена указывает на присутствие ДНК, она может быть использована для констатации наличия или отсутствия ядер в клетках, их размеров, формы, местоположения, а интенсивность окрашивания может дать косвенные представления о количественных изменениях ДНК.

В процессе гидролиза ДНК в течении 8 мин в 1 н. растворе соляной кислоты при температуре 60°C в мазках, окрашенных по Романовскому–Гимзе, основной краситель (метиленовая синь) отходил с мазков в раствор соляной кислоты, окрашивая его в синий цвет. Мазки промывали в дистиллированной воде, быстро ополаскивали в холодном 1 н. растворе соляной кислоты и переносили в реактив Шиффа на 16 ч при температуре от 0 до 4°C (время экспозиции выбрано опытным путем). Не споласкивая, мазки последовательно помещали в три порции сернистой воды на 2 мин в каждую. Препараты промывали в дистиллированной воде по 10 мин и сушили на воздухе.

Такое перекрашивание оригинальных архивных мазков позволяет точно идентифицировать место ядерной ДНК тироцитов и ДНК возможных внутриклеточных инфекций в цитоплазме тироцитов и в эритроцитах крови. Эритроциты, первоначально окрашенные эозином, сохраняют свой цвет без изменения.

Результаты

В мазках из содержимого кист, окрашенных по Романовскому–Гимзе, были выявлены эритроциты и «медузоподобные» структуры синего цвета размером от 5 до 20 мкм и более. Другие эритроциты, окрашенные эозином в оранжевый цвет, содержали внутриклеточные (эндоглобулярные) включения (рис. 1, вклейка).

При АИТ (рис. 2–5, вклейка) и УЗ (рис. 6–13, вклейка) в фолликулярных клетках выявлена мелкая базофильная зернистость 0,1–1,0 мкм, свидетельствующая о кислом характере структуры. В тироцитах удалось отследить эволюцию этой зернистости. В отдельных тироцитах может находиться от одного и более мелких включений до заполнения ими всей цитоплазмы клетки с приобретением ею шаровидной формы. В цитоплазме тироцитов можно увидеть крупные круглые образования (от 5 до 10 мкм) подобные шизогонии базофильно окрашенных включений. Мелкая базофильная зернистость при микроскопии отмечается не только в цитоплазме, но и на ядрах и внутри вакуолей ядер тироцитов. Из-за внутриклеточной базофильной зернистости цитоплазма клетки гиперплазируется, ее размер становится по сравнению с размером ядра больше в 15–25 раз. В клетках, цитоплазма кото-

рых заполнена множественными базофильными включениями, не завершается цитокинез, поэтому в тироците может быть 2 и более ядер с выраженным полиморфизмом. В последующем базофильная зернистость покидает клетку, и в клетке остается вакуолизирующая гиперплазированная цитоплазма с деструктурированным и вакуолизованным ядром. Присутствие в узловых образованиях щитовидной железы подобных тироцитов свидетельствует об отсутствии их литической гибели, возможно, из-за выключенного апоптоза. Деструкция цитоплазмы и ядра тироцита, естественно, снижает его секреторную функцию. Микроскопическое исследование с иммерсией эритроцитов крови в проходящем свете, попадающих в мазок при ТАПБ, показало наличие в эритроцитах при АИТ (рис. 14–16, вклейка) и УЗ (рис. 17–21, вклейка) беспигментных эндоглобулярных включений, эритроциты были цитоадгезированы и вакуолизованы, что более свойственно для кровепаразитарных инфекций крови (бабезии, тейлерии — отряд *Piroplasmida*, класс *Sporozoa*, тип *Apicomplexa*, подцарство *Protozoa*).

В результате окрашивания цитологических мазков ТАПБ по Фельгену реактивом Шиффа удалось:

- в «медузоподобных» структурах из содержимого кист, являющихся, по всей вероятности, экзоэритроцитарной стадией развития гемоспоридий, локализовать находящуюся в них и некоторых эритроцитах паразитарную ДНК (рис. 22, вклейка);

- при аутоиммунном тиреоидите локализовать ядерную ДНК тироцитов и паразитарную ДНК в виде точечных включений и диффузно распределенной в цитоплазме тироцитов, а также ДНК в эритроцитах крови в виде ядер разных размеров, окрашенных в малиново-сиреневый цвет (рис. 23–26, вклейка);

- при узловом зобе также локализовать ядерную ДНК тироцитов и ДНК гемоспоридий в виде точечных включений и диффузно распределенной в цитоплазме тироцитов. Отмечена деформация, деградация, вакуолизация и уменьшение ядер тироцитов под воздействием развития гемоспоридий (рис. 27–31, вклейка). ДНК гемоспоридий в эритроцитах крови проявилась в виде ядер разных размеров, окрашенных в малиново-сиреневый цвет (рис. 32, 33, вклейка).

Окрашенная по Фельгену ДНК, выявленная в эритроцитах крови, однозначно свидетельствует о наличии кровепаразитарной инфекции. Наличие ДНК в эритроцитах без пигмента гемозоина характерно для бабезий и тейлерий. Не исключено наличие в мазках еще не изученного вида гемоспоридий. Выявление ДНК в эритро-

цитах с пигментом гемозоином свойственно малярийному плазмодию. В нашем исследовании пигмент гемозоин в эритроцитах отсутствовал, что позволило исключить в образцах наличие малярийного плазмодия. Ядерный материал гемоспоридий в эритроцитах был разных размеров, что может свидетельствовать о разных видах и/или генерациях возбудителя. Неокрашенная специальным красителем протоплазма кровепаразитарной инфекции выявлялась в виде светлой полосы вокруг ядер в эритроцитах.

Обсуждение

Как было показано ранее на животных, для гемоспоридий сем. *Piroplasmidae* местом шизогонии являются эндотелий кровеносных и лимфатических сосудов, а также клетки паренхиматозных органов, и только потом происходит заражение эритроцитов крови [6]. В легких, в местах локализации колоний экзоэритроцитарной стадии развития (*Babesia equi*), отмечены поражения в виде узлов размерами от 5 мм и более [11]. На пике инвазии гемоспоридий в кровяном русле может не быть, однако зараженность эритроцитов во внутренних органах может быть высокой [10].

Следует учитывать, что у двух видов бабезий (*Babesia equi* = *Theileria equi* и *Babesia microti*) начальная стадия жизненного цикла проходит в лимфоцитах и лимфоузлах, где образуются шизонты [29]. Развитие паразитов в лимфоидной ткани приводит к выраженной гиперплазии лимфатических узлов [30]. Увеличение лимфоузлов отмечали и при заражении другими видами гемоспоридий [20]. Поэтому перенос экзоэритроцитарной стадии развития может быть как из лимфоузла к месту формирования опухоли, так и наоборот.

При неопухольевых процессах [2] зернистость в цитоплазме тироцитов содержит липофусцин и гемосидерин — пигменты крови. Пигмент липофусцин принято считать нормальным компонентом клетки, отражающим преобладание процессов аутооксидации и пероксидации, направленных на поддержание внутриклеточного гомеостаза. Накопление липофусцина определяется снижением активности дыхательных ферментов и преобладании гликолиза, что отмечается при истощающих заболеваниях и повышении функциональной нагрузки на орган [8]. Как было показано на животных, развитие гемоспоридийной инфекции в крови приводит к нарушению окислительно-восстановительных процессов. По мере развития заболевания газовый и энергетический обмен повышается, а коэффициент утилизации кислорода, отражающий степень окислительно-восстановительных процессов в тканях на высоте инвазии, снижается [10].

Иллюстрации к статье «Кровепаразитарная инфекция как причина возникновения воспалительных реакций и доброкачественных образований щитовидной железы человека» (авторы: А.В. Терлецкий, Л.Г. Ахмерова, Е.В. Евтушенко) (с. 155–161) (1-й фрагмент; продолжение см. на с. II)

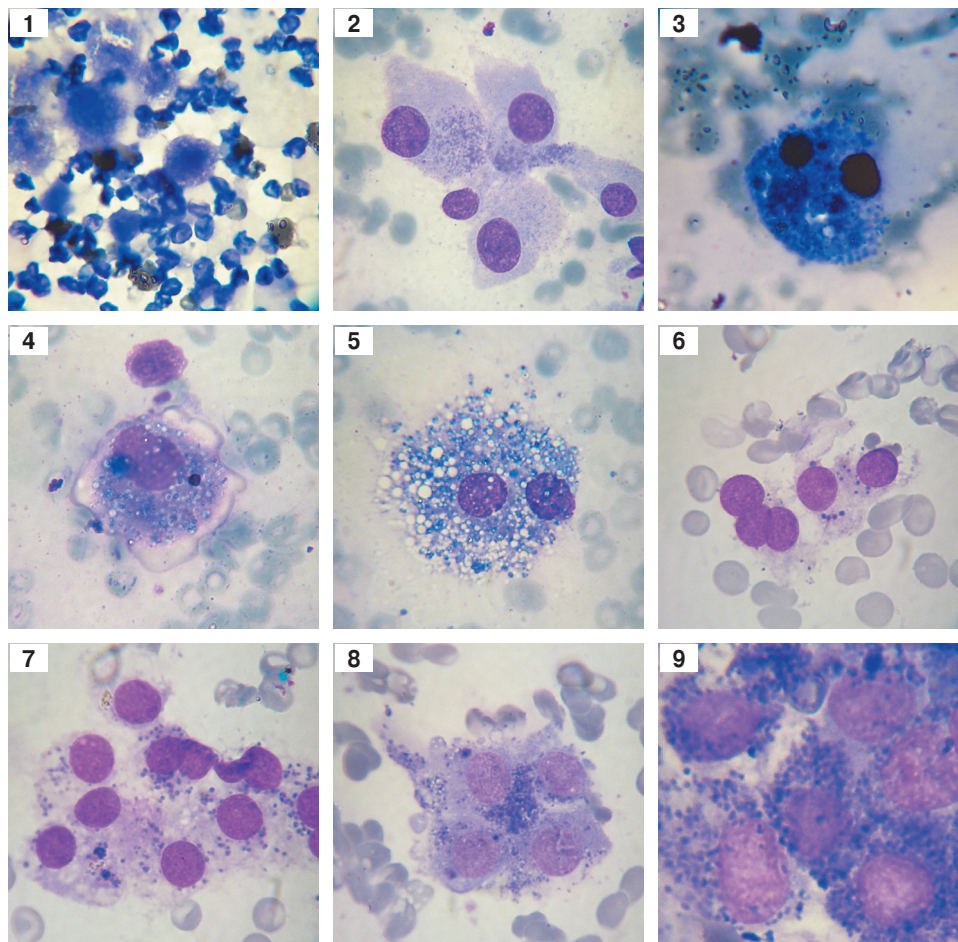


Рисунок 1. Киста. В содержимом кисты присутствуют «медузоподобные» структуры и эритроциты с эндоглобулярными включениями. Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 1. A cyst. Note medusiform structures and erythrocytes containing endoglobular inclusions inside the cysts. Romanowsky–Giemsa staining

Рисунок 2. Аутоиммунный тиреоидит. В цитоплазме тироцита присутствует мелкая базофильная зернистость. Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 2. Autoimmune thyroiditis. A small basophilic punctation is found inside thyrocyte cytoplasm. Romanowsky–Giemsa staining

Рисунок 3. Аутоиммунный тиреоидит. Цитоплазма тироцита заполнена базофильными включениями с двумя участками повышенной оптической плотности (шизогония). В эритроцитах присутствуют эндоглобулярные включения. Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 3. Autoimmune thyroiditis. Thyrocyte cytoplasm is filled with basophilic inclusions with two high-optical density regions (schizogony). Endoglobular inclusions are observed inside erythrocytes. Romanowsky–Giemsa staining

Рисунок 4. Аутоиммунный тиреоидит. Тироцит с базофильной зернистостью в цитоплазме. Отмечается начало вакуолизации в цитоплазме и ядре. Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 4. Autoimmune thyroiditis. Thyrocytes containing basophilic punctation in the cytoplasm are observed. Note a vacuolization onset in the cytoplasm and nuclei. Romanowsky–Giemsa staining

Рисунок 5. Аутоиммунный тиреоидит. Двухядерный тироцит с базофильной зернистостью в цитоплазме и ядре. Незавершенный цитокинез. Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 5. Autoimmune thyroiditis. A binuclear thyrocyte with a basophilic punctation in the cytoplasm and nuclei is observed. Incomplete cytokinesis. Romanowsky–Giemsa staining

Рисунок 6. Узловой зоб. Появление базофильной зернистости в цитоплазме тироцита. Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 6. Nodular goiter. Basophilic punctation emerging in the thyrocyte cytoplasm. Romanowsky–Giemsa staining

Рисунок 7. Узловой зоб. Тироциты с групповым скоплением базофильной зернистости в цитоплазме. Количество базофильной зернистости возрастает. Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 7. Nodular goiter. Thyrocytes containing clustered basophilic punctation in the cytoplasm are observed. Note an increasing amount of basophilic punctation. Romanowsky–Giemsa staining

Рисунок 8. Узловой зоб. Заполнение на половину цитоплазмы тироцита базофильной зернистостью. Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 8. Nodular goiter. Note a thyrocyte cytoplasm half-filled with basophilic punctation. Romanowsky–Giemsa staining

Рисунок 9. Узловой зоб. Заполнение всей цитоплазмы тироцита базофильной зернистостью. Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 9. Nodular goiter. Note a thyrocyte cytoplasm fully filled with basophilic punctation. Romanowsky–Giemsa staining

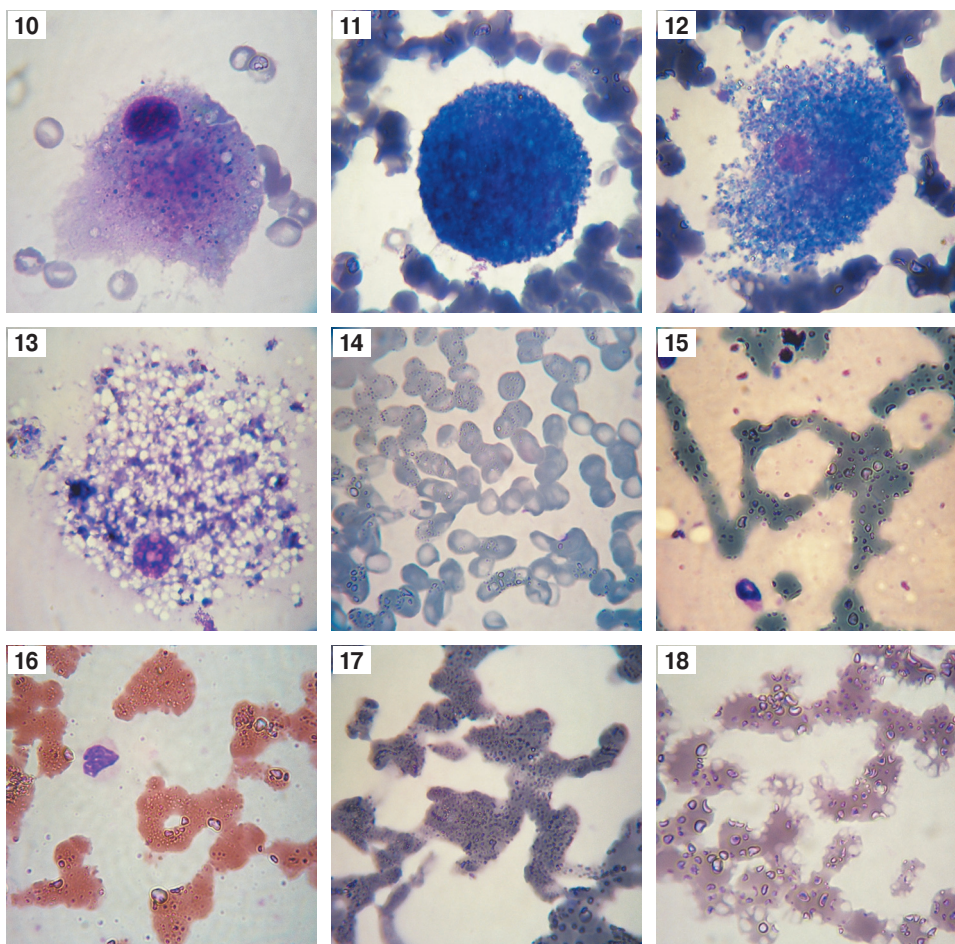


Рисунок 10. Узловой зоб. Вся цитоплазма тироцита и поверхность ядра заполнена базофильной зернистостью. Вакуоли в цитоплазме. Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 10. Nodular goiter. Note that entire thyrocyte cytoplasm and nuclear surface are filled with basophilic punctation. Cytoplasmic vacuoles. Romanowsky–Giemsa staining

Рисунок 11. Узловой зоб. Вся цитоплазма тироцита заполнена базофильной зернистостью. Клетка приобретает шаровидную форму. Эндоглобулярные включения такой же оптической плотности и окраски присутствуют в эритроцитах. Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 11. Nodular goiter. Note that entire thyrocyte cytoplasm is filled with basophilic punctation. A spheroid cell shaping. Erythrocytes contain endoglobular inclusions of the same optical density and color. Romanowsky–Giemsa staining

Рисунок 12. Узловой зоб. Выход базофильной зернистости из тироцита. Эндоглобулярные включения такой же оптической плотности и окраски присутствуют в эритроцитах. Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 12. Nodular goiter. Basophilic punctation released from thyrocytes. Erythrocytes contain endoglobular inclusions of the same optical density and color. Romanowsky–Giemsa staining

Рисунок 13. Узловой зоб. Базофильная зернистость покинула клетку. Видны вакуолизированная цитоплазма и ядро, цитоплазма гиперплазирована. Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 13. Nodular goiter. Note that was fully released from thyrocytes. Vacuolated cytoplasm and nuclei, cytoplasm hyperplasia. Romanowsky–Giemsa staining

Рисунок 14. Аутоиммунный тиреоидит. Эритроциты крови с мелкими эндоглобулярными включениями. Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 14. Autoimmune thyroiditis. Note blood erythrocytes contain small endoglobular inclusions. Romanowsky–Giemsa staining

Рисунок 15. Аутоиммунный тиреоидит. Эритроциты крови с эндоглобулярными включениями разных размеров. Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 15. Autoimmune thyroiditis. Note blood erythrocytes contain endoglobular inclusions of various sizes. Romanowsky–Giemsa staining

Рисунок 16. Аутоиммунный тиреоидит. Выраженная цитoadгезия эритроцитов крови с эндоглобулярными включениями разных размеров. Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 16. Autoimmune thyroiditis. A marked cytoadhesion observed for blood erythrocytes containing endoglobular inclusions of various sizes. Romanowsky–Giemsa staining

Рисунок 17. Узловой зоб. Цитoadгезия эритроцитов крови с эндоглобулярными включениями. Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 17. Nodular goiter. Note a cytoadhesion observed for blood erythrocytes containing endoglobular inclusions. Romanowsky–Giemsa staining

Рисунок 18. Узловой зоб. Цитoadгезированные вакуолизированные эритроциты крови с эндоглобулярными включениями. Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 18. Nodular goiter. Cytoadhesive vacuolated erythrocytes containing endoglobular inclusions. Romanowsky–Giemsa staining

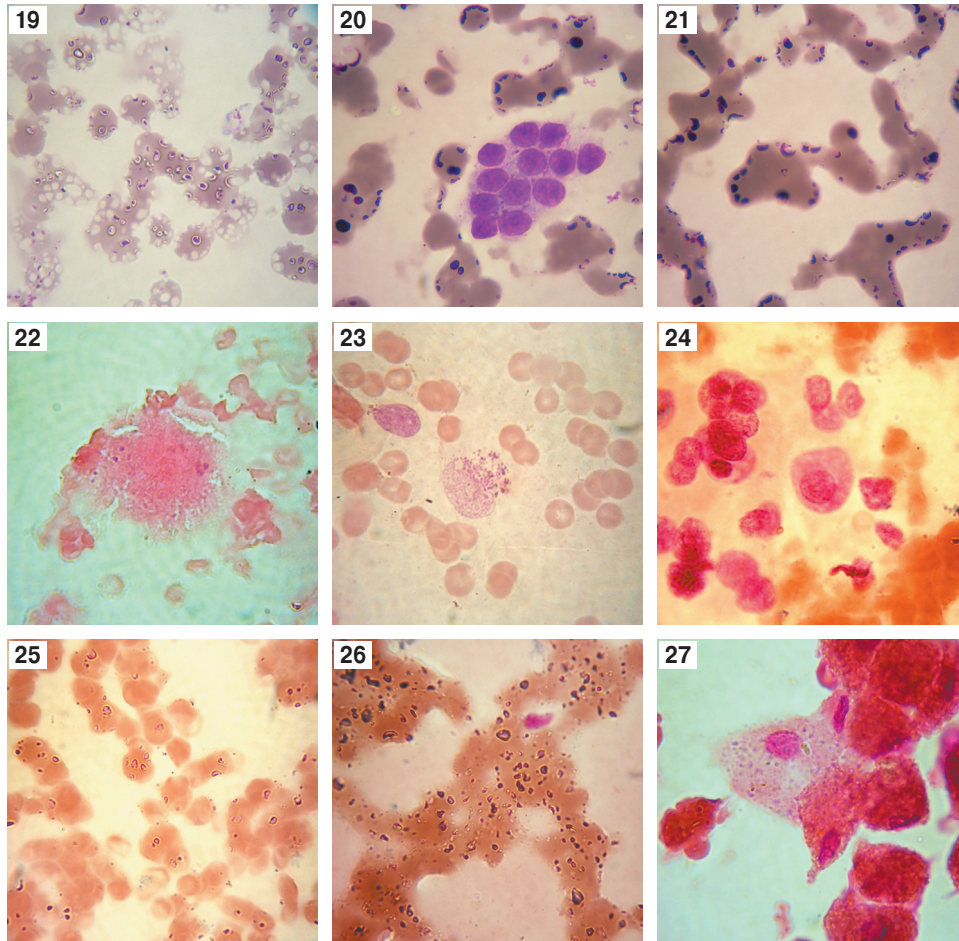


Рисунок 19. Узловой зоб. Цитоадгезированные вакуолизированные эритроциты крови с эндоглобулярными включениями. Видно синее ядро и окружающая его светлая протоплазма, типичная для гемоспоридийной инфекции крови. Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 19. Nodular goiter. Cytoadhesive vacuolated erythrocytes containing endoglobular inclusions. Note a blue nucleus and surrounding light-colored protoplasm typical to hemosporidian infection. Romanowsky–Giemsa staining

Рисунок 20. Узловой зоб. Цитоадгезированные эритроциты крови с эндоглобулярными включениями. Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 20. Nodular goiter. Cytoadhesive vacuolated erythrocytes containing endoglobular inclusions. Romanowsky–Giemsa staining

Рисунок 21. Узловой зоб. Цитоадгезированные эритроциты крови с эндоглобулярными включениями по центру или по периферии эритроцита. Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 21. Nodular goiter. Cytoadhesive vacuolated erythrocytes containing centered or peripheral endoglobular inclusions. Romanowsky–Giemsa staining

Рисунок 22. Киста. Экзоэритроцитарная форма гемоспоридий в «медузоподобных» образованиях. Окр. по Фельгену

Figure 22. A cyst. Note exoerythrocytic hemosporidia inside medusiform structures. Feulgen staining

Рисунок 23. Аутоиммунный тиреоидит. ДНК гемоспоридий в виде точек в цитоплазме тироцита. Окр. по Фельгену

Figure 23. Autoimmune thyroiditis. Punctate hemosporidian DNA observed in thyrocyte cytoplasm. Feulgen staining

Рисунок 24. Аутоиммунный тиреоидит. Диффузное распределение ДНК гемоспоридий в цитоплазме тироцита. Окр. по Фельгену

Figure 24. Autoimmune thyroiditis. A diffuse hemosporidian DNA distribution observed in thyrocyte cytoplasm. Feulgen staining

Рисунок 25. Аутоиммунный тиреоидит. Ядра (ДНК) гемоспоридий в эритроцитах крови. Окр. по Фельгену

Figure 25. Autoimmune thyroiditis. Hemosporidian nuclei (DNA) observed inside blood erythrocytes. Feulgen staining

Рисунок 26. Аутоиммунный тиреоидит. Цитоадгезия эритроцитов крови с ядрами (ДНК) гемоспоридий внутри. Окр. по Фельгену

Figure 26. Autoimmune thyroiditis. Hemosporidian nucleus (DNA)-containing erythrocyte cytoadhesion. Feulgen staining

Рисунок 27. Узловой зоб. Ядра (ДНК) гемоспоридий в тироцитах. Видна деформация и деградация ядер. Окр. по Фельгену

Figure 27. Nodular goiter. Hemosporidian nuclei (DNA) observed inside thyrocytes. Deformed and degraded nuclei are observed. Feulgen staining

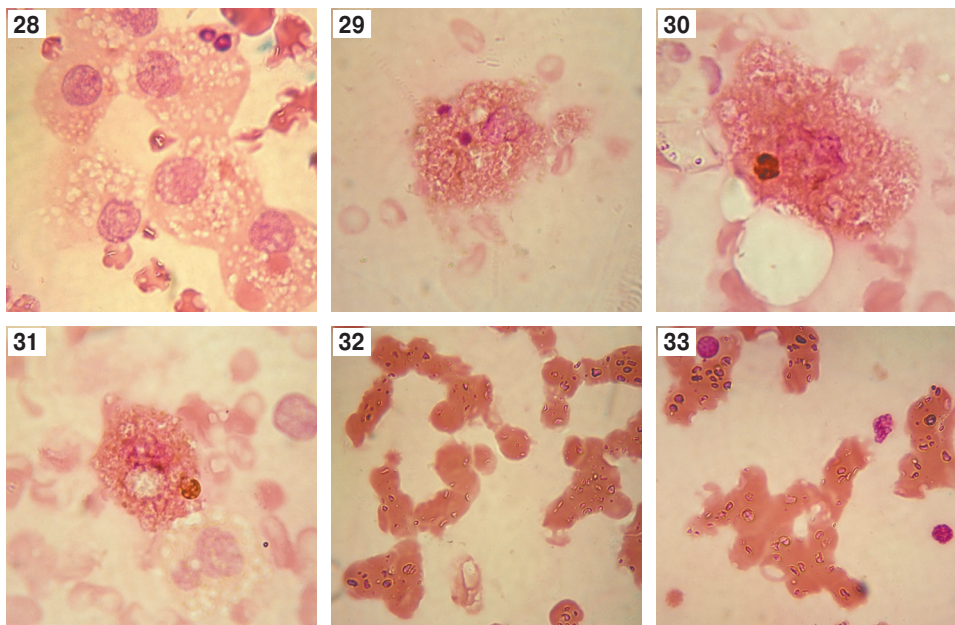


Рисунок 28. Узловой зоб. Вакуолизация ядер и цитоплазмы тироцитов. В цитоплазме видны два участка шизогонии гемоспоридий. Окр. по Фельгену

Figure 28. Nodular goiter. Thyrocyte vacuolated nuclei and cytoplasm are observed. Note two regions of hemosporean schizogony in the thyrocyte cytoplasm. Feulgen staining

Рисунок 29. Узловой зоб. Деградация ядра тироцита. Диффузное нахождение ДНК гемоспоридий в цитоплазме тироцита и участок шизогонии гемоспоридий. Окр. по Фельгену

Figure 29. Nodular goiter. Thyrocyte nucleus degradation. Diffuse hemosporean DNA inside thyrocyte cytoplasm and a region of hemosporean schizogony are observed. Feulgen staining

Рисунок 30. Узловой зоб. Деградация ядра тироцита. Диффузное нахождение ДНК гемоспоридий в цитоплазме тироцита и участок шизогонии гемоспоридий. Окр. по Фельгену

Figure 30. Nodular goiter. Thyrocyte nucleus degradation. Diffuse hemosporean DNA inside thyrocyte cytoplasm and a region of hemosporean schizogony are observed. Feulgen staining

Рисунок 31. Узловой зоб. Деградация ядра тироцита. Диффузное нахождение ДНК гемоспоридий в цитоплазме тироцита и участок шизогонии гемоспоридий. Окр. по Фельгену

Figure 31. Nodular goiter. Thyrocyte nucleus degradation. Diffuse hemosporean DNA inside thyrocyte cytoplasm and a region of hemosporean schizogony are observed. Feulgen staining

Рисунок 32. Узловой зоб. Ядра гемоспоридий в эритроцитах крови. Окр. по Фельгену

Figure 32. Nodular goiter. Note hemosporean nuclei inside blood erythrocytes. Feulgen staining

Рисунок 33. Узловой зоб. Цитоадгезия эритроцитов с ядрами гемоспоридий внутри. Окр. по Фельгену

Figure 33. Nodular goiter. Note hemosporean nucleus-positive erythrocyte cytoadhesion. Feulgen staining

Появление пигмента гемосидерина объясняется депонированием мерозоитами гемоспоридий в своей протоплазме белка гемоглобина в качестве энергетического материала для нахождения в плазме крови, при внедрении в эндотелий сосудов и клетки паренхиматозных органов, где происходит шизогония [25]. Находящийся в мерозоитах белок гемоглобин, естественно, будет давать положительную реакцию на пигменты крови. Возможно также развитие в процессе паразитирования гемоспоридий интраваскулярного гемолиза, вследствие разрушения эритроцитов, приводящего к накоплению гемосидерина в тироцитах.

Ультраструктурные особенности спорозитов и мерозоитов гемоспоридий таковы, что на апикальной части тела имеются роптрии и микронемы с протеолитическими ферментами. Данные органеллы позволяют им легко проникать через клеточные мембраны посредством их лизиса внутрь клеток для паразитирования.

Для бабезий свойственно образовывать из мембран эритроцитов тубулярные структуры (трубочки), позволяющие им длительно находиться в эритроците хозяина. Методами электронной микроскопии на мембранах пораженных эритроцитов выявлены перфорации — поры, или «метаболические окна» [24]. Через эти структуры происходит сброс метаболитов и антигенов за пределы эритроцитов. Наличие антигенов паразитов при премунисии в плазме крови вызывает постоянное антигенное возбуждение в иммунной системе [9]. Выброс через «метаболические окна» на поверхность эритроцита цитоадгезивных лигандов — антигенов VESA1 (variant erythrocyte surface antigen-1) приводит формированию выступов — knobов — на мембране эритроцита, посредством которых эритроциты адгезируются с эндотелием сосудов и другими эритроцитами. Это один из механизмов, с помощью которого паразит избегает иммунного ответа макроорганизма в селезенке. Цитоадгезия эритроцитов в сосудах может приводить к выраженной ишемии органов и тканей с включением механизма анаэробного гликолиза вплоть до полного тромбирования сосудов с развитием инсультов и инфарктов [13, 26].

Не исключено, что цитоадгезивные лиганды будут появляться не только на мембранах эритроцитов и инфицированного эндотелия сосудов, но и на мембранах клеток паренхиматозных органов, в которых развиваются гемоспоридии. Известно, что клетки щитовидной железы между собой соединяются при помощи пятен слипания терминальных пластинок и многочисленных десмосом, а также пальцевидных выступов (интердигитаций), входящих в соответствующие вдавления соседнего тироцита, таким образом связь клеток фолликулярного эпителия стано-

вится еще крепче, снаружи фолликулы покрыты базальной мембраной. Фолликулы отграничены тонкими прослойками рыхлой соединительной ткани, интенсивно снабженной гемо- и лимфососудистой сетью. Обильное кровоснабжение щитовидной железы обеспечивается сонной артерией, и по степени кровоснабжения щитовидная железа занимает одно из первых мест среди других органов [1, 3]. Вены щитовидной железы образуют сплетение с венами околощитовидной железы, имеющими лакунообразные расширения, которые могут быть удобным местом для задержки эритроцитов в этих местах и развития в них гемоспоридий.

Опухолевое проявление гемоспоридийной инфекции — это хроническое течение инвазии, при котором инфицированию подвержены эритроциты, клетки ретикулоэндотелиальной системы, паренхиматозных органов. Развивается анемия, гипоксия и интоксикация, что серьезно усугубляет процесс, и приводит к снижению функции противоопухолевого иммунитета [6, 7, 15, 33].

Внутриклеточное хроническое персистирование возбудителей болезней объясняется способностью патогена управлять процессом запрограммированной гибели клеток (апоптозом), направленным на поддержание жизни клетки, а, следовательно, на выживание возбудителя, что связывают с большинством заболеваний и в первую очередь — с аутоиммунными, онкологическими, нейротрофическими заболеваниями и некоторыми болезнями крови [5].

Развитие гемоспоридийной инфекции в щитовидной железе может приводить к гипофункции [23]. Не исключено, что на определенных стадиях развития некоторых видов и/или генераций гемоспоридий в тироцитах возможна и гиперфункция щитовидной железы.

Ранее Вирхов (1859), Шеррик с соавт. (1964), Косицкий (1962) высказали гипотезу о роли метастатической инфекции (или трансфекции ДНК) как фактора сигнально-опосредованного превращения нормальных клеток в опухолевые на новом месте, отвергая «заражение свободными отделившимися клетками» родоначальной неоплазмы [цит. по 4]. Полученные нами результаты согласуются с данной гипотезой.

Если ранее клиническое проявление кровепаразитарных (гемоспоридийных) инфекций связывали с укусами клещей, то сейчас известна роль «лучистых тельц» как определенной стадии жизненного цикла тейлерий и бабезий, возникающих из яйцевидной эритроцитарной стадии, называемой гамонтами, и передающихся кровососущими насекомыми [30]. Заражение гемоспоридиями (бабезиями из семейства *Piroplasmidae*) возможно при переливании донорской крови и ее продуктов [18, 19, 27, 34, 35], трансплацентарно [21, 22, 31, 32, 33], при пере-

садке органов и тканей [14, 16, 17], на экспериментальных животных (мышях) показан оральный путь заражения [28]. Не исключена вероятность полового пути заражения.

В нашей стране клиническое проявление гемоспоридийных (зоонозных и зооантропонозных) инфекций у человека по-прежнему считается предположительно возможным, а чаще — маловероятным заболеванием. Плановые исследования, диагностика и терапия больных, к сожалению, не проводятся.

Выводы

Исследованиями установлено, что первопричиной воспалений и доброкачественных опухолей щитовидной железы может являться внутриклеточная гемоспоридийная инфекция, развитие которой происходит в эритроцитах (бесполое бинарное деление) и тироцитах (шизогония).

Исследования мазков, окрашенных по Фельгену, показали, что при узловом зобе внутриклеточное развитие гемоспоридийной инфекции в тироцитах приводит к гиперплазии цитоплазмы и ее вакуолизации, ядра тироцитов при этом деформируются, вакуолизируются, уменьшаются в размерах и деградируют (с высокой вероятностью мутаций и делеций в ДНК), достигая преднеопластического уровня.

Доброкачественная с точки зрения патоморфологии опухоль может иметь злокачественный (неопластический) потенциал под воздействием гемоспоридий с дальнейшим проникновением гемоспоридий вглубь щитовидной железы с вовлечением в процесс других фолликулов и типов клеток. Отсутствие литической гибели инфицированных тироцитов можно объяснить способностью гемоспоридий управлять апоптозом клеток.

Хирургическое удаление доброкачественной опухоли не может гарантировать полного выздоровления, так как в крови и тканях остается гемоспоридийная инфекция, способная рецидивировать на прежнем месте или «метастазировать» на фоне хирургического стресса в другие органы и ткани с током крови в виде интра- и экзоэритроцитарной стадий развития с дальнейшей злокачественной трансформацией клеток на новом месте. Возможно усугубление процесса проявлением дополнительной клинической манифестации.

Планируем продолжить такое же цитологическое исследование документированного архивного материала со злокачественными опухолями щитовидной железы и в последующем определить молекулярно-генетическими методами видовую принадлежность гемоспоридийной инфекции.

Список литературы/References

1. Александровская О.В., Радостина Т.Н., Козлов Н.А. Цитология, гистология, эмбриология. М.: Агропромиздат, 1987. 448 с. [Aleksandrovskaya O.V., Radostina T.N., Kozlov N.A. Cytology, histology, embryology. Moscow: Agropromizdat, 1987. 448 p. (In Russ.)]
2. Воробьев С.Л. Морфологическая диагностика заболеваний щитовидной железы (цитология для патологов, патология для цитологов). СПб.: Коста, 2014. 104 с. [Vorobyov S.L. Morphological diagnosis of thyroid diseases (cytology for pathologists, pathology for cytologists). St. Petersburg: Costa, 2014. 104 p. (In Russ.)]
3. Елисеева В.Г., Афанасьева Ю.И., Юрина Н.А. Гистология. М.: Медицина, 1983. 592 с. [Eliseeva V.G., Afanasyeva Yu.I., Yurina N.A. Histology. Moscow: Medicine, 1983. 592 p. (In Russ.)]
4. Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П. Механизмы развития болезней и синдромов. СПб.: 2002. 507 с. [Zaichik A.Sh., Churilov L.P. Mechanisms of development of diseases and syndromes. St. Petersburg, 2002. 507 p. (In Russ.)]
5. Зигангирова Н.А., Гинцбург А.Л. Роль апоптоза в регуляции инфекционного процесса // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2004. № 6. С. 106–113. [Zigangirova N.A., Ginzburg A.L. The role of apoptosis in the regulation of the infectious process. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 2004, no. 6, pp. 106–113. (In Russ.)]
6. Колабский Н.А. О развитии гемоспоридий сем. Piroplasmidae в организме позвоночных животных // Сб. тр. Ленинградского ветеринарного института. Вып. XIV. 1954. С. 9–24. [Kolabsky N.A. On the development of hemosporidia of the family Piroplasmidae in the body of vertebrates. Proceedings of Leningrad Veterinary Institute, iss. XIV, 1954, pp. 9–24. (In Russ.)]
7. Крылов М.В. Пироплазмиды. Л.: Наука; 1981. 230 с. [Krylov M.V. Pyroplasmids. Leningrad: Nauka, 1981, 230 p. (In Russ.)]
8. Серов В.В., Пауков В.С. Ультраструктурная патология. М.: Медицина, 1975. 432 с. [Serov V.V., Paukov V.S. Ultrastructural pathology. Moscow: Medicine, 1975. 432 p. (In Russ.)]
9. Симоварт Ю., Пракс Я. Гематология и лейкозы сельскохозяйственных животных. Т. 1. Казань, 1969. 546 с. [Simovart Yu., Prax Ya. Hematology and leukemia of agricultural animals. Vol. 1. Kazan, 1969. 546 p. (In Russ.)]
10. Терентьев Ф.А., Марков А.А., Польшковский М.Д. Болезни овец. М., 1963. 520 с. [Terentyev F.A., Markov A.A., Polykovsky M.D. Diseases of sheep. Moscow, 1963. 520 p. (In Russ.)]
11. Трофимов И.Т. Протозойные болезни сельскохозяйственных животных (гемоспориозы и трипанозомозы). М., 1955. 237 с. [Trofimov I.T. Protozoan diseases of farm animals (hemosporidiosis and trypanosomiasis). Moscow, 1955. 237 p. (In Russ.)]
12. Шкурупий В.А., Полоз Т.Л. Цитоморфология фолликулярных опухолей щитовидной железы. Дифференциальная диагностика методом компьютерного анализа изображений и нейросетевых технологий. Новосибирск: Наука, 2009. 190 с. [Shkurupiy V.A., Poloz T.L. Cytomorphology of thyroid follicular tumors. Differentiated diagnostics using the method of computerized image analysis and neuronetwork technologies. Novosibirsk: Nauka, 2009. 190 p. (In Russ.)]

13. Allred D.R. Antigenic variation in babesiosis: is there more than one “why”. *Microb. Infect.*, 2001, vol. 3, pp. 481–491.
14. Ather I., Pourafshar N., Schain D., Gupte A., Casey M.J. Babesiosis: an unusual cause of sepsis after kidney transplantation and review of the literature. *Transpl. Infect. Dis.*, 2017, vol. 19, no. 5, doi: 10.1111/tid.12740
15. Auerbach M., Haubenstock A., Soloman G. Systemic babesiosis. Another cause of the hemophagocytic syndrome. *Am. J. Med.*, 1986, vol. 80, pp. 301–303.
16. Bade N.A., Yared J.A. Unexpected babesiosis in a patient with worsening anemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 2016, vol. 128, no. 7, pp. 1019. doi: 10.1182/blood-2016-05-717900
17. Brennan M.B., Herwaldt B.L., Kazmierczak J.J., Weiss J.W., Klein C.L., Leith C.P., He R., Oberley M.J., Tonnetti L., Wilkins P.P., Gauthier G.M. Transmission of *Babesia microti* parasites by solid organ transplantation. *Emerg. Infect. Dis.*, 2016, vol. 22, no. 11, pp. 1869–1876. doi: 10.3201/eid2211.151028
18. Dedd R. Y. Transmission of parasites by blood transfusion. *Vox Sang.*, 1998, vol. 74, pp. 161–163.
19. Dobroszycki J., Herwardt B. L., Boctor F., Miller J.R., Linden J., Eberhard M.L., Yoon J.J., Ali N.M., Tanowitz H.B., Graham F., Weiss L.M., Wittner M. A cluster of transfusion-associated babesiosis cases traced to a single asymptomatic donor. *JAMA*, 1999, vol. 281, no. 10, pp. 927–930.
20. Entrican H., Williams H., Cook I.A., Lancaster W.M., Clark J.C. Babesiosis in man: a case from Scotland. *Br. Med. J.*, 1979, vol. 2, 474 p.
21. Feder H.M., Lawlor M., Krause P.J. Babesiosis in pregnancy. *N. Engl. J. Med.*, 2003, vol. 349, no. 2, pp. 195–196.
22. Fox L.M., Wingerter S., Ahmed A., Arnold A., Chou J., Rhein L., Levy O. Neonatal babesiosis: case report and review of the literature. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2006, vol. 25, no. 2, pp. 169–173.
23. Hatcher J.C., Greenberg P.D., Antique J., Jimenez-Lucho V.E. Severe babesiosis in Long Island: review of 34 cases and their complications. *Clin. Inf. Dis.*, 2001, vol. 32, no. 8, pp. 1117–1125.
24. Kawai S., Igarashi I., Abgaandorjiin A., Ikadai H., Omata Y., Saito A., Nagasawa H., Toyoda Y., Suzuki N., Matsuda H. Tubular structures associated with *Babesia caballi* in equine erythrocytes in vitro. *Parasitol. Res.*, 1999, vol. 85, pp. 171–175.
25. Kawai S., Igarashi I., Abgaandorjiin A., Miyazawa K., Ikadai H., Nagasawa H., Fujisaki K., Mikami T., Suzuki N., Matsuda H. Ultrastructural characteristics of *Babesia caballi* in equine erythrocytes in vitro. *Parasitol. Res.*, 1999, vol. 85, pp. 794–799.
26. Kjemtrup A.M., Conrad P.A. Human babesiosis: an emerging tick-borne disease. *Int. J. Parasitol.*, 2000, vol. 30, pp. 1323–1337.
27. LeBel D.P. 2nd, Moritz E.D., O’Brien J.J., Lazarchick J., Tormos L.M., Duong A., Fontaine M.J., Squires J.E., Stramer S.L. Cases of transfusion-transmitted babesiosis occurring in nonendemic areas: a diagnostic dilemma. *Transfusion*, 2017, vol. 57, no. 10, pp. 2348–2354. doi: 10.1111/trf.14246
28. Malagon F., Tapia J.L. Experimental transmission of *Babesia microti* infection by the oral route. *Parasitol. Res.*, 1994, vol. 80, no. 8, pp. 645–648.
29. Mehlhorn H., Schein E. Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein 1998. *Parasitol. Res.*, 1998, vol. 84, pp. 467–475.
30. Mehlhorn H., Schein E. The piroplasms: “A long story in short” or “Robert Koch has seen it”. *Eur. J. Protistol.*, 1993, vol. 29, pp. 279–293. doi: 10.1016/S0932-4739(11)80371-8
31. New D.L., Quinn J.B., Quresbi M.Z., Sigler S.J. Vertically transmitted babesiosis. *J. Pediatrics.*, 1997, pp. 163–164.
32. Raucher H.S., Jaffin H., Glass J.L. Babesiosis in pregnancy. *Obstetrics & Gynecology*, 1984, vol. 63, no. 3, pp. 7S–9S.
33. Rech A., Bittar C.M., Castro C.G. Jr., Azevedo K.R., Santos R.P., Machado A.R.L., Schwartzmann G., Goldani L., Brunetto A.L. Asymptomatic babesiosis in a child with hepatoblastoma. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 2004, vol. 26, no. 3, pp. 213.
34. Snyder E.L., Dodd R.Y. Reducing the risk of blood transfusion. *Hematology*, 2001, vol. 1, pp. 433–448.
35. Wei Q., Tsuji M., Zamoto A., Konsaki M., Matsui T., Shiota T., Telford III S.R., Ishihara C. Human babesiosis in Japan: isolation of *Babesia microti*-like parasites from an asymptomatic transfusion donor and from a rodent from an area where babesiosis is endemic. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, vol. 39, no. 6, pp. 2178–2183.

Авторы:

Терлецкий А.В., к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск, Россия;
Ахмерова Л.Г., к.б.н., ученый секретарь Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск, Россия;
Евтушенко Е.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск, Россия.

Поступила в редакцию 14.05.2018
 Принята к печати 05.03.2019

Authors:

Terletsky A.V., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Molecular Genetics, Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation;
Akhmerova L.G., PhD (Biology), Scientific Secretary, Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation;
Evtushenko E.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Genetics, Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation.

Received 14.05.2018
 Accepted 05.03.2019

КРЫМСКАЯ ГЕМОРАГИЧЕСКАЯ ЛИХОРАДКА: КЛИМАТИЧЕСКИЕ ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗМЕНЕНИЙ АКТИВНОСТИ ПРИРОДНОГО ОЧАГА НА ЮГЕ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

А.Н. Куличенко, Д.А. Прислегина

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Резюме. Цель исследования — изучение влияния современных климатических изменений на природный очаг КГЛ на юге Европейской части Российской Федерации и заболеваемость населения этой инфекцией. *Материалы и методы.* В работе использованы итоговые годовые отчеты по заболеваемости КГЛ, предоставленные Управлениями Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в субъектах Южного и Северо-Кавказского федеральных округов, результаты эпизоотологического мониторинга за возбудителем КГЛ на территории Волгоградской, Ростовской областей и Ставропольского края. Гидрометеорологические данные были получены из базы данных ФГБУ «ВНИИГМИ-МЦД», архивов метеостанций, а также из Государственных докладов «О состоянии окружающей среды и природопользовании в Ставропольском крае» за 2011–2016 гг. *Результаты.* Впервые определено влияние климатических факторов на развитие каждой фазы жизненного цикла иксодовых клещей *H. marginatum* — основного переносчика вируса КГЛ на юге Европейской части Российской Федерации. Показана прямая корреляция значений сезонных аномалий температуры воздуха, определяющей численность иксодовых клещей, и уровня заболеваемости населения КГЛ. Установлено комплексное влияние температуры воздуха и количества выпавших осадков на формирование популяций *H. marginatum* (на примере Ставропольского края). Продемонстрирована корреляция периодов подъема заболеваемости КГЛ с температурными условиями, благоприятными для развития иксодовых клещей. Отрицательные значения аномалий температуры воздуха зафиксированы в годы, предшествующие снижению числа больных КГЛ. Отмечена связь между уровнем заболеваемости КГЛ и степенью увлажнения весенне-летнего и осеннего периодов предшествующего года, оказывающей влияние на жизнедеятельность, процесс метаморфоза преимагинальных фаз клещей и численность популяций *H. marginatum* последующей генерации. Установлена тенденция к расширению ареала возбудителя КГЛ со смещением границы в северном направлении, обусловленная влиянием климатических изменений. Обнаружение вируссофорных иксодовых клещей на территории районов Волгоградской области, граничащих с Приволжским федеральным округом, свидетельствует о риске распространения вируса КГЛ за пределы южных регионов Российской Федерации.

Ключевые слова: Крымская геморрагическая лихорадка, изменения климата, жизненный цикл клещей *Hyalomma marginatum*, заболеваемость населения.

Адрес для переписки:

Прислегина Дарья Александровна
355035, Россия, г. Ставрополь, ул. Советская, 13–15,
ФКУЗ Ставропольский противочумный институт.
Тел.: 8 (962) 448-73-57 (моб.). Тел./факс: 8 (8652) 26-03-12.
E-mail: daria775@rambler.ru

Contacts:

Daria A. Prislegina
355035, Russian Federation, Stavropol, Sovetskaya str., 13–15,
Stavropol Plague Control Research Institute.
Phone: +7 (962) 448-73-57 (mobile). Phone/fax: 8 (8652) 26-03-12.
E-mail: daria775@rambler.ru

Библиографическое описание:

Куличенко А.Н., Прислегина Д.А. Крымская геморрагическая лихорадка: климатические предпосылки изменений активности природного очага на юге Российской Федерации // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 1. С. 162–172. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-162-172

Citation:

Kulichenko A.N., Prislegina D.A. Climatic prerequisites for changing activity in the natural Crimean Congo hemorrhagic fever focus in the South of the Russian Federation // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 162–172. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-162-172

CLIMATIC PREREQUISITES FOR CHANGING ACTIVITY IN THE NATURAL CRIMEAN-CONGO HEMORRHAGIC FEVER FOCUS IN THE SOUTH OF THE RUSSIAN FEDERATION

Kulichenko A.N., Prislegina D.A.

Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor, Stavropol, Russian Federation

Abstract. Subject of study. Examining an impact of the contemporary climatic changes on the natural CCHF focus as well as CCHF incidence in the South of the European part of the Russian Federation. Materials and methods. Annual Epidemiological Report on CCHF Incidence provided by Departments of the Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing in the subjects of the Southern and the North-Caucasian Federal Districts, CCHF Epizootologic Monitoring Report on the territory of the Volgograd Region, Rostov Region and Stavropol Region were used in the study. Hydrometeorological data were obtained from the database of the All-Russian Research Institute of Hydrometeorological Information — World Data Center, weather station archives as well as The 2011–2016 National Report on the State of Environment in the Stavropol Region. Results. For the first time, climatic factors affecting each phase of the life cycle of ixodid tick *Hyalomma marginatum* which is the main CCHF virus vector in the South of the European part of the Russian Federation were identified. A direct correlation between seasonal air temperature fluctuations determining ixodid tick count and CCHF incidence was demonstrated. It was found that the average air temperature and accumulated precipitation collectively affect *H. marginatum* population (e.g., in Stavropol Region). Peak CCHF incidence was demonstrated to correlate with temperature conditions favorable to developing ixodid ticks. In contrast, air temperature fluctuations were noted to negatively impact in the years preceding decreased CCHF incidence. A relation between CCHF incidence and degree of wetting during preceding spring-and-summer as well as autumn seasons affecting vital activity, metamorphosis in pre-imaginal stages and count of the next-generation *H. marginatum* was revealed. Moreover, CCHF virus tended to expand geographic range northwards due to an effects of climatic changes. Virus-carrying Ixodidae found on the territory of the administrative districts of the Volgograd Region adjacent to the Volga Federal District evidence about a risk of CCHF virus spreading outside the Southern Regions of the Russian Federation.

Key words: *Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF), climatic changes, life cycle of Hyalomma marginatum ticks, morbidity.*

В течение последних лет эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым трансмиссивным инфекциям на территории Российской Федерации сохраняется напряженной — множественные случаи заболевания населения клещевым вирусным энцефалитом, клещевым боррелиозом, а также Крымской геморрагической лихорадкой регистрируются ежегодно. На развитие эпидемического процесса данной группы инфекционных болезней комплексное влияние оказывают абиотические, биотические и социальные (в том числе проводимые профилактические мероприятия) факторы. При этом динамика заболеваемости трансмиссивными инфекциями в значительной степени зависит от погодно-климатических условий, определяющих численность и активность членистоногих переносчиков возбудителей инфекционных болезней.

В пятом Оценочном докладе Межправительственной группы экспертов по изменению климата (2013 г.) однозначно утверждается факт сохраняющегося глобального потепления климата [22]. Согласно Второму оценочному докладу Росгидромета об изменениях климата и их последствиях на территории Российской Федерации (2014 г.), скорость продолжающегося потепления в России в целом более чем в 2,5 раза выше средней по планете — температура повышается на 0,45°C за 10 лет. При этом,

наблюдаемая на сегодняшний день некоторая тенденция к снижению темпов всемирного потепления для территории нашей страны не прослеживается. Изменение климата в России не сводится лишь к повышению средней температуры воздуха у поверхности Земли, но проявляется во всех компонентах климатической системы, в том числе в изменениях гидрологического режима и экстремальности климата [6, 4, 12].

Наблюдаемые климатические изменения оказывают влияние на распространение и численность специфических переносчиков возбудителей трансмиссивных природно-очаговых инфекционных болезней, их прокормителей и, как следствие, на уровень заболеваемости населения. Одной из наиболее ранних работ, посвященных изучению данной проблемы, является статья Н.Б. Бирюля, Л.И. Залуцкой «Потепление климата и вспышки клещевого энцефалита», опубликованная в 1965 г. В дальнейшем зависимость формирования популяций членистоногих переносчиков от влияния погодно-климатических факторов была подтверждена результатами многих отечественных и зарубежных исследований [1, 18, 19, 20, 21]. На сегодняшний день доказано, что увеличение количества дней с высокой температурой и пониженной влажностью воздуха способствует повышению численности и удлинению сезон-

ного периода активности клещей. Высокая численность специфических переносчиков возбудителей трансмиссивных инфекций, в свою очередь, приводит к росту инфицирования людей. Так, несмотря на деградацию природных очагов клещевого энцефалита, наблюдаемую с начала XXI в., множественные случаи заболевания, в том числе с летальными исходами, ежегодно регистрируются на территории эндемичных субъектов Российской Федерации [10, 14]. Также отмечаются высокие уровни заболеваемости клещевым боррелиозом и клещевыми риккетсиозами [17].

Для здоровья населения юга России серьезную угрозу представляет Крымская геморрагическая лихорадка (КГЛ) — особо опасная природно-очаговая арбовирусная инфекция, напряженная эпидемиологическая обстановка по которой сохраняется в течение последних двух десятилетий на территории большинства субъектов Южного и Северо-Кавказского федеральных округов [3, 8, 11]. Основным переносчиком и резервуаром вируса ККГЛ на территории России являются иксодовые клещи *H. marginatum*, высокие показатели численности которых определяют рост заболеваемости населения [7, 14, 15, 16]. При этом на сегодняшний день проблеме влияния климатических изменений на стадии жизненного цикла и активность клещей данного вида не уделяется достаточного внимания. Изучение связи погодных-климатических факторов, определяющих количество клещей *H. marginatum*, и заболеваемости населения КГЛ нами было выполнено на примере Ставропольского края, высокоэндемичного по данной природно-очаговой инфекции [3, 11, 13].

Материалы и методы

В работе использованы итоговые годовые отчеты по заболеваемости КГЛ за 2012–2017 гг., предоставленные Управлениями Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в субъектах Южного и Северо-Кавказского федеральных округов, и результаты эпизоотологического мониторинга за возбудителем КГЛ на территории Ставропольского края за 2012–2017 гг., проводимого специалистами ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора и ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Ставропольском крае. Гидрометеорологические данные были получены из базы данных ФГБУ ВНИИГМИ-МЦД (<http://www.meteo.ru>), архивов метеостанций, размещенных на сайте <https://rp5.ru>, а также из Государственных докладов «О состоянии окружающей среды и природопользовании в Ставропольском крае» за 2011–2016 гг.

Результаты

С момента активизации природного очага КГЛ в 1999 г. отмечается ежегодная регистрация множественных случаев заболевания на территории практически всех административных районов Ставропольского края. Благоприятные ландшафтно-географические и климатические условия, а также широкий спектр мелких млекопитающих и птиц, являющихся прокормителями основного переносчика вируса ККГЛ — клещей *H. marginatum*, благоприятствуют формированию и поддержанию природного очага

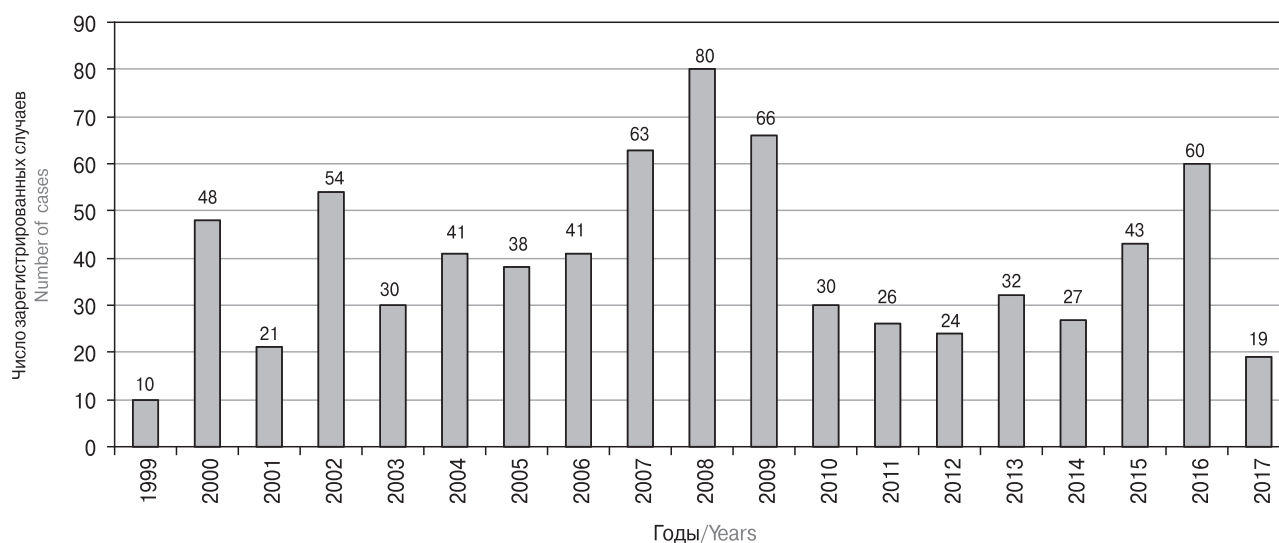


Рисунок 1. Число выявленных случаев заболевания КГЛ в Ставропольском крае с 1999 по 2017 гг.

Figure 1. 1999–2017 CCHF prevalence in the Stavropol Region

данной инфекции в регионе. Всего за исследуемый девятнадцатилетний период было зарегистрировано 753 больных КГЛ (рис. 1).

По данным эпидемиологического анамнеза, заражение в большинстве случаев происходило инокуляционным или контаминационным путем передачи возбудителя КГЛ при уходе за сельскохозяйственными животными, являющимися основными прокормителями имаго клещей. Поэтому высокий уровень заклещевленности крупного и мелкого рогатого скота, обусловленный повышенной численностью *H. marginatum*, прямо коррелирует с ростом заболеваемости населения КГЛ.

Как при многих природно-очаговых инфекциях, заболеваемость КГЛ имеет циклический характер. Первый пик отмечался в 2005–2009 гг., с 2015 г. начался очередной подъем заболеваемости. Для определения связи климатических изменений и динамики эпидемических проявлений КГЛ необходимо четко определить особенности влияния условий окружающей среды на каждую фазу развития основных переносчиков вируса КГЛ, в конечном итоге определяющих численность их популяции.

Жизненный цикл иксодовых клещей данного вида включает 4 морфологические стадии: яйцо и 3 активные — личинка, нимфа и взрос-

лая особь (имаго), последовательная смена которых в значительной мере зависит от влияния погодных-климатических факторов соответствующего сезонного периода [2, 11] (рис. 2).

Для начала и завершения цикла своего развития клещам требуется определенное количество тепловой энергии (сумма эффективных температур). Так, активизация перезимовавших особей *H. marginatum* и их питание на сельскохозяйственных животных начинаются весной при достижении значений дневной температуры воздуха $+9^{\circ}\text{C}$ и ночной не ниже $+2^{\circ}\text{C}$ при солнечной маловетреной погоде — обычно с апреля (несколько позже к этой популяции присоединяются имаго, перелинявшие из перезимовавших нимф) [2, 7, 11]. Пик паразитирования отмечается при среднемесячной температуре воздуха $+16,9^{\circ}\text{C}$ и обычно приходится на май. Длительность питания самок клещей 6–15 суток (максимум 22), после отпадения через 3–22 дня начинается процесс яйцекладки. Эмбриогенез при оптимальной температуре $+26^{\circ}\text{C}$... $+28^{\circ}\text{C}$ проходит за 23–28 суток, то есть от отпадения сытой самки до появления в природе личинок новой генерации проходит от 28 до 40 дней. При температуре воздуха, ниже указанной, развитие яиц задерживается [7, 11]. Повышенные значения температуры в весен-

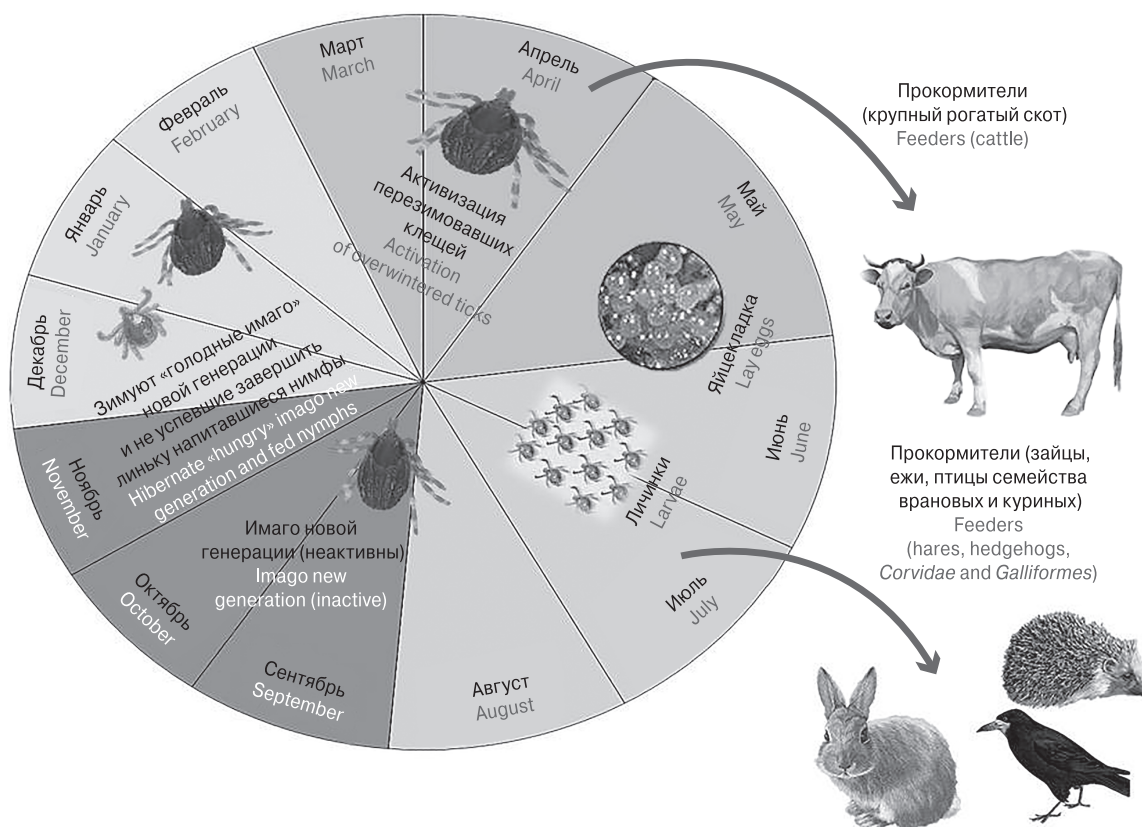


Рисунок 2. Схема жизненного цикла клещей *H. marginatum*

Figure 2. Scheme of *H. marginatum* life cycle

ний период, напротив, способствуют более ранней активизации перезимовавших особей *H. marginatum*, удлинению периода их активной жизнедеятельности и, как следствие, увеличению численности клещей последующей генерации. Губительно на преимагинальные фазы клещей действуют как обильные осадки, так и их недостаток, вызывающий сухость почвы. Личинки появляются в природе во второй половине июня — начале июля. Прокормителями преимагинальных форм клещей являются мелкие млекопитающие, ежи и, особенно, птицы, кормящиеся на земле (грачи, вороны, куропатки, домашние птицы, индейки). Появление личинок отмечается со второй половины июня, а нимф — с первой половины июля [2, 7, 11, 15, 16]. Холодная погода оказывает неблагоприятное влияние на выживаемость личинок. Питание преимагинальных форм клещей на хозяине продолжается от 14 до 28 дней. В сентябре на птицах обнаруживаются лишь единичные личинки и нимфы. Напитавшиеся нимфы, отпавшие от прокормителей осенью и не успевшие перелинять в имаго, зимуют в природе и линяют в имаго весной следующего года [2, 7, 11]. Появившиеся осенью взрослые особи не представляют ни эпизоотической, ни эпидемиологической опасности, так как большинство из них до весны находятся в неактивном состоянии, не обладают агрессивностью и не нападают на животных. Таким образом зимуют напитавшиеся нимфы и голодные имаго. Затяжная, теплая, с умеренным режимом увлажнения осень оказывает благоприятное влияние на жизнедеятельность клещей и может увеличить продолжительность эпидемического сезона. Важный фактор сохранения

жизнеспособности зимующих форм иксодовых клещей — отсутствие низких температур в декабре—феврале. При длительных отрицательных температурах воздуха (ниже -20°C) имеет место промерзание почвы и отмечается гибель клещей [2, 7, 11, 15, 16].

Можно проследить определенную связь между значениями сезонных температурных аномалий воздуха на юге России, влияющих на численность популяции *H. marginatum*, и заболеваемостью населения КГЛ (рис. 3–5).

На представленных графиках видно, что рост температур воздуха, создавая благоприятные условия для развития клещей *H. marginatum* (в весенний период) и сохранения их жизнеспособности (в осенне-зимний период), приводит к увеличению риска заражения населения вирусом ККГЛ и росту количества выявленных больных КГЛ. Наибольшие показатели положительных температурных аномалий и числа выявленных случаев заболевания КГЛ зарегистрированы в 2016 г. Снижение количества больных КГЛ в 2017 г., напротив, совпадает с отрицательными сезонными аномалиями температуры воздуха.

При изучении многофакторного влияния климатических предикторов на клещей *H. marginatum* необходимо также учитывать такой показатель, как количество выпавших осадков. Данный климатический фактор оказывает наиболее важное влияние в весенне-летний период, когда в природе происходит процесс яйцекладки и развитие преимагинальных фаз *H. marginatum*.

Данные, приведенные в таблицах 1 и 2, позволяют проследить связь значений указанных климатических факторов, определяющих числен-



Рисунок 3. Значения весенних аномалий температур воздуха на юге России и число выявленных случаев заболевания населения КГЛ

Figure 3. Spring air temperature fluctuations in the South of the Russian Federation and CCHF prevalence



Рисунок 4. Значения осенних аномалий температур воздуха на юге России и число выявленных случаев заболевания населения КГЛ

Figure 4. Autumn air temperature fluctuations in the South of the Russian Federation and CCHF prevalence

ность клещей *H. marginatum* последующей генерации, с числом больных КГЛ в Ставропольском крае на протяжении последних пяти лет.

Таким образом, рост числа случаев заболевания КГЛ в Ставропольском крае был зарегистрирован в 2013 и 2015–2016 гг. Формированию высокой численности популяций основного переносчика вируса ККГЛ — клещей *H. marginatum*, способствовали благоприятные погодно-климатические условия предшествующего эпидемического сезона (2012, 2014 и 2015 гг. соответственно). Положительные температурные аномалии зимнего периода обеспечили сохранение жиз-

неспособности большинства зимующих особей клещей. Погодно-климатические условия весеннего периода (положительные значения аномалий температуры воздуха и оптимальное количество выпавших осадков) обеспечили более раннее начало активной жизнедеятельности перезимовавших иксодовых клещей, их питания на прокормителях, а также процесса яйцекладки. Положительные температурные аномалии и равномерный, достаточный режим увлажнения летнего сезона оказали благоприятное влияние на развитие преимагинальных фаз, определяя высокую численность популяций клещей последующей генерации. Теплая



Рисунок 5. Значения зимних аномалий температур воздуха на юге России и число выявленных случаев заболевания населения КГЛ

Figure 5. Winter air temperature fluctuations in the South of the Russian Federation and CCHF prevalence

Таблица 1. Значения сезонных аномалий температуры воздуха в Ставропольском крае за 2011–2016 гг. (°С) и число больных КГЛ, зарегистрированных в последующем эпидемическом сезоне (2012–2017 гг.)

Table 1. 2011–2016 Seasonal air temperature (°C) fluctuations in the Stavropol Region and CCHF prevalence in subsequent 2012–2017 epidemic season

Год Year	Весна Spring	Лето Summer	Осень Autumn	Зима Winter	Число больных КГЛ CCHF prevalence
2011	+0,1...+2,5	-1,2...+0,8	-2,1...+0,3	-0,5...-4,3	24 (2012 г.)
2012	+2,6...+3,8	+2,2...+3,5	+0,8...+2,2	+0,2...+1,4	32 (2013 г.)
2013	-0,2...+2,6	-0,4...-2,4	-1,4...-4,5	-1,1...-3,9	27 (2014 г.)
2014	+1,7...+5,4	+0,9...+3,5	+0,7...+2,5	+0,4...+6,0	43 (2015 г.)
2015	+3,2...+7,2	+2,1...+5,1	+2,3...+3,6	+1,1...+7,2	60 (2016 г.)
2016	-1,2...-3,4	-3,5...+5,9	-1,4...-3,2	-0,8...-4,6	19 (2017 г.)

с дефицитом осадков осень способствовала удлинению периода активной жизнедеятельности нимф и имаго новой генерации.

Снижение числа больных КГЛ в 2012, 2014, и 2017 гг. — результат неблагоприятного действия климатических факторов предшествующего эпидемического сезона на все стадии развития иксодовых клещей. Отрицательные температурные аномалии зимнего периода были причиной гибели большей части «голодных имаго» и нимф. Неблагоприятное влияние на сохранивших жизнеспособность особей *H. marginatum* оказали отрицательные значения аномалий температуры воздуха, избыточный режим увлажнения весеннего периода, а также появление заморозков в начале апреля. Кроме того, низкая численность иксодовых клещей была обусловлена неблагоприятными для развития преимагинальных фаз *H. marginatum* погодно-климатическими условиями летнего сезона. Значения температуры воздуха в июне-июле были ниже среднеголетних (в 2016 г. с начала июля до середины августа, напротив,

отмечалась чрезмерно жаркая погода, также оказавшая отрицательное влияние на смену стадий жизненного цикла клещей). Режим увлажнения летнего сезона был неравномерным — периоды значительного дефицита осадков с проявлениями почвенной засухи (достигающих критериев опасного метеорологического явления) чередовались с выпадением обильных ливневых дождей, сопровождающихся градом. Осенью неблагоприятное влияние на готовящихся к зимовке особей *H. marginatum* оказали отрицательные значения аномалий температуры воздуха с ранним появлением заморозков и избыточное количество выпавших осадков.

Кроме влияния на развитие и численность популяций клещей *H. marginatum*, наблюдаемые базовые климатические изменения также способствуют расширению ареала вируса ККГЛ на территории Российской Федерации. На сегодняшний день четко прослеживается выраженная тенденция смещения границы распространения возбудителя КГЛ в северном направлении. Изменения границ обусловлены,

Таблица 2. Значения сезонных аномалий количества выпавших осадков в Ставропольском крае за 2011–2016 гг. (в % от нормы) и число больных КГЛ, зарегистрированных в последующем эпидемическом сезоне (2012–2017 гг.)

Table 2. 2011–2016 Seasonal air temperature (% normal range) fluctuations in the Stavropol Region and CCHF prevalence in subsequent 2012–2017 epidemic season

Год Year	Весна Spring	Лето Summer	Осень Autumn	Зима Winter	Число больных КГЛ CCHF prevalence
2011	110–220	10–300	150–180	45–90	24 (2012 г.)
2012	90–120	95–110	30–70	70–84	32 (2013 г.)
2013	120–150	70–150	180–200	99–102	27 (2014 г.)
2014	85–95	110–120	80–100	80–120	43 (2015 г.)
2015	80–100	90–110	70–110	90–110	60 (2016 г.)
2016	160–180	10–190	120–170	110–140	19 (2017 г.)

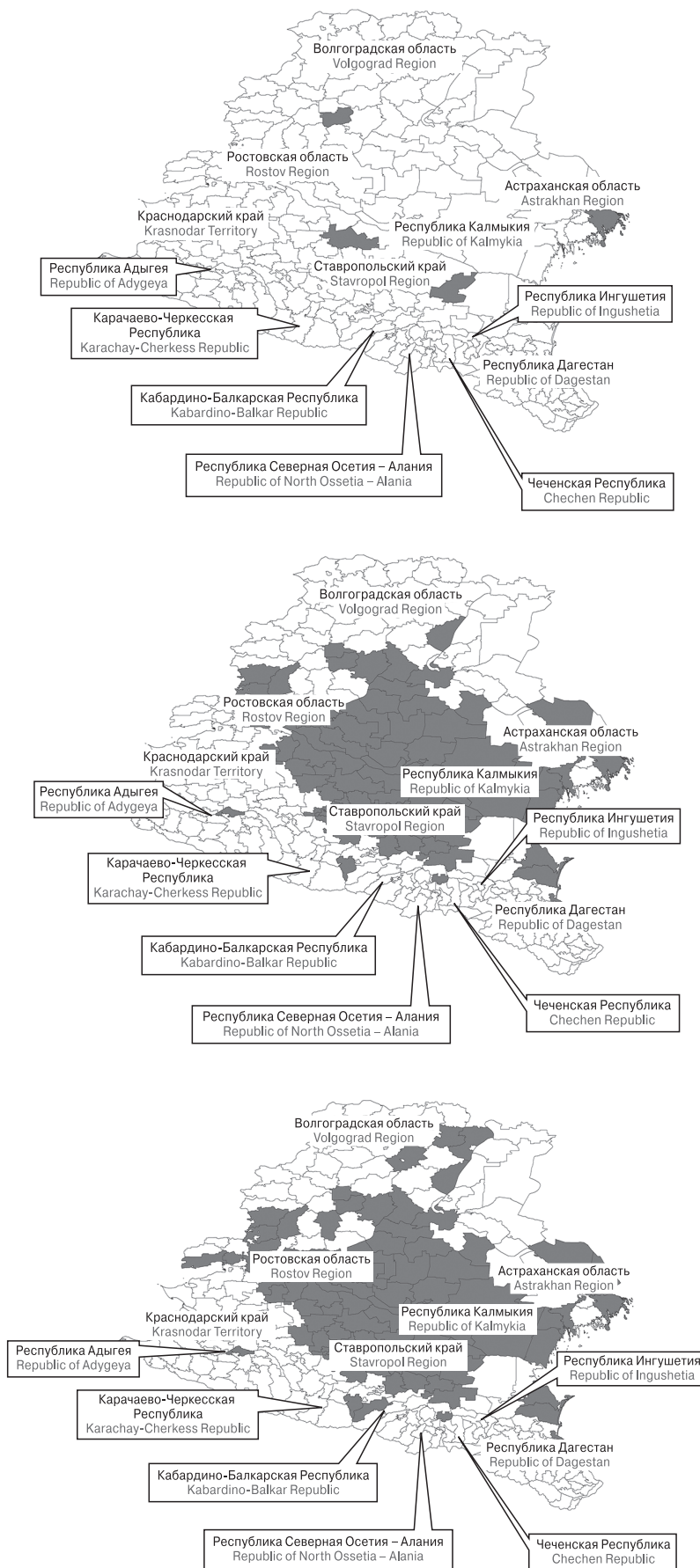


Рисунок 6. Тенденция расширения границы ареала возбудителя КГЛ в северном направлении
 Figure 6. CCHF virus tends to expand geographic range northwards

прежде всего, влиянием повышенной среднегодовой температуры приземного воздуха и характером увлажнения территорий. Так, установлено смещение северной границы ареала клещей *H. marginatum* в Ростовской области на 45 км (с 49°26' с. ш. в 2003 г. до 49°52' с. ш. в 2015 г.) с вовлечением в эпидемический процесс административных районов, где ранее случаи заболевания не регистрировались (Морозовский, Белокалитвинский, Аксайский и Каменский) [5]. Циркуляция вируса ККГЛ подтверждена результатами положительных находок маркеров возбудителя в пробах полевого материала на указанных территориях. Кроме того, в течение последних лет вирусоформные иксодовые клещи выявлены в северных районах Волгоградской области, граничащими с Приволжским федеральным округом (Саратовский область) — Жирновском и Камышинском [9] (рис. 6).

Сохраняющаяся для территории Российской Федерации тенденция потепления климата, проявляющаяся в виде положительных температурных аномалий всех сезонов года, оказывает благоприятное влияние на все стадии развития иксодовых клещей *H. marginatum* и способствует смещению границ циркуляции вируса ККГЛ в северном направлении. Высокая численность основного переносчика возбудителя КГЛ и расширение ареала его распространения способствует росту заболеваемости населения.

Заключение

Таким образом, наблюдаемые современные тенденции изменения климата на территории России оказывают положительное влияние

на развитие иксодовых клещей *H. marginatum*. Высокая эпизоотическая активность природного очага КГЛ способствуют сохранению напряженной эпидемиологической обстановки по данному заболеванию на территории субъектов юга европейской части Российской Федерации.

Результаты проведенных нами исследований демонстрируют комплексное многофакторное влияние климата на смену всех стадий жизненного цикла основного переносчика и резервуара вируса КГЛ. Кроме общеизвестного действия температуры воздуха на развитие иксодовых клещей нами на примере Ставропольского края показана связь динамики эпидемических проявлений КГЛ с режимом увлажнения территории в различные периоды года. Выявлено, что наиболее значительное влияние на жизнедеятельность *H. marginatum* оказывают температурный режим и количество осадков в конце мая и июне — начале июля, когда происходят процесс яйцекладки и развитие преимагинальных фаз. Кроме того, сохранение жизнеспособности зимующих особей клещей зависит от значений температуры в январе — начале февраля. Таким образом, многофакторное действие климата определяет не только длительность периода активности имаго, но и численность особей последующей генерации.

Вследствие продолжающегося потепления климата происходит смещение границы ареала возбудителя КГЛ в северном направлении. Это создает риск распространения инфекции за пределы южных регионов Российской Федерации с вовлечением в эпидемический процесс новых территорий.

Список литературы/References

1. Алексеев А.Н. Влияние глобального изменения климата на кровососущих эктопаразитов и передаваемых ими возбудителей болезней // Вестник РАМН. 2006. № 3. С. 21–25. [Alexeyev A.N. The effects of global climatic changes on bloodsucking ectoparasites and pathogens they transmit. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk = Herald of the Russian Academy of Sciences*, 2006, no. 3, pp. 21–25. (In Russ.)]
2. Балашов Ю.С. Иксодовые клещи — паразиты и переносчики инфекций. СПб.: Наука, 1998. 287 с. [Balashov Yu.S. Ixodid ticks are parasites and vectors of infectious diseases. *St. Petersburg: Nauka*. 287 p. (In Russ.)]
3. Василенко Н.Ф., Малецкая О.В., Манин Е.А., Прислегина Д.А., Волынкина А.С., Лисицкая Я.В., Шапошникова Л.И., Таран Т.В., Куличенко А.Н. Причины обострения эпидемиологической обстановки по Крымской геморрагической лихорадке в Российской Федерации в 2016 году // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2017. № 5. С. 17–23. [Vasilenko N.F., Maletskaya O.V., Manin E.A., Prislegina D.A., Volynkina A.S., Lisitskaya Y.V., Shaposhnikova L.I., Taran T.V., Kulichenko A.N. Causes of deterioration epidemiological situation on Crimean-Congo hemorrhagic fever in the Russian Federation in 2016. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2017, no. 6, pp. 17–23. (In Russ.)]
4. Второй оценочный доклад Росгидромета об изменениях климата и их последствиях на территории Российской Федерации. М.: Росгидромет, 2014. 1004 с. [Second Assessment Report on climate change and its consequences on the territory of the Russian Federation. *Moscow: Roshydromet*, 2014. 1004 p. (In Russ.)]
5. Дворцова И.В., Айдинов Г.Т., Москвитина Э.А., Швагер М.М. Иксодовые клещи Ростовской области: биоразнообразие, распространение, эпидемиологическое значение // ПестМенеджмент (РЭТ-инфо). 2015. № 1. С. 26–33. [Dvortsova I.V., Aydinov G.T., Moskvitina E.A., Shvager M.M. Ixodic ticks of the Rostov region: biodiversity, area, epidemiological significance. *PestMenedzhtment (RET-info) = Pest-Management (RAT-info)*, 2015, no. 1, pp. 26–33. (In Russ.)]

6. Доклад о климатических рисках на территории Российской Федерации. СПб., 2017. 106 с. [Report on the climate risks on the territory of the Russian Federation. *St. Petersburg, 2017. 106 p. (In Russ.)*]
7. Кошкина Н.А., Горячая Е.В. Морфобиологическая характеристика клеща *Hyalomma marginatum marginatum* и меры борьбы с ним // Российский паразитологический журнал. 2013. № 2. С. 10–14. [Koshkina N.A., Goryachaya E.V. The description of tick morphobiology *Hyalomma marginatum marginatum* and its control. *Rossiyskiy parazitologicheskii zhurnal = Russian Journal of Parasitology, 2013, no. 2, pp. 10–14. (In Russ.)*]
8. Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Василенко Н.Ф., Манин Е.А., Прислегина Д.А., Дубянский В.М., Григорьев М.П. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекционным болезням в Южном, Северо-Кавказском и Крымском федеральных округах в 2015 г.: аналитический обзор. Ставрополь: Литера, 2016. С. 7–18. [Kulichenko A.N., Maletskaya O.V., Vasilenko N.F., Manin E.A., Prislegina D.A., Dubyanskiy V.M., Grigoryev M.P. Epidemiological situation on natural focal infectious diseases in the territory of Southern, North-Caucasian and Crimean Federal Districts in 2015: analytical review. *Stavropol: Litera, 2016. pp. 7–18. (In Russ.)*]
9. Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Василенко Н.Ф., Манин Е.А., Прислегина Д.А., Дубянский В.М., Григорьев М.П. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекционным болезням в Южном и Северо-Кавказском федеральных округах в 2016 г.: аналитический обзор. Ставрополь, 2017. С. 8–18. [Kulichenko A.N., Maletskaya O.V., Vasilenko N.F., Manin E.A., Prislegina D.A., Dubyanskiy V.M., Grigoryev M.P. Epidemiological situation on natural focal infectious diseases in the territory of Southern and North-Caucasian Federal Districts in 2016: analytical review. *Stavropol, 2017. pp. 8–18. (In Russ.)*]
10. 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 infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections, 2017, no. 1, pp. 37–43. doi:10.21055/0370-1069-2017-1-37-43 (In Russ.)*]
11. Онищенко Г.Г., Ефременко В.И., Бейер А.П. Крымская геморрагическая лихорадка. М.: ГОУ ВУНМЦ, 2005. 269 с. [Onishchenko G.G., Efremenko V.I., Beyer A.P. Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Moscow: GOUVUNMTs, 2005. 269 p. (In Russ.)*]
12. Оценочный доклад об изменениях климата и их последствиях на территории Российской Федерации. Т. II. Последствия изменения климата. М.: Росгидромет, 2008. 291 с. [Assessment Report on climate change and its consequences in the Russian Federation. vol. II. Effects of climate change. *Moscow: Roshydromet, 2008. 291 p. (In Russ.)*]
13. Прислегина Д.А., Малецкая О.В., Василенко Н.Ф., Манин Е.А., Ковальчук И.В. Эпидемиологические особенности природно-очаговых инфекционных болезней в Ставропольском крае в 2015 году // Здоровье населения и среда обитания. 2017. № 1. С. 52–55. [Prislegina D.A., Maletskaya O.V., Vasilenko N.F., Manin E.A., Kovalchuk I.V. Epidemiological features of natural focal infections in the Stavropol region in 2015. *Zdorov'e naseleniia i sreda obitaniia = Public Health and Environment, 2017, no. 1, pp. 52–55. (In Russ.)*]
14. Ревич Б.А. Изменение здоровья населения России в условиях меняющегося климата // Проблемы прогнозирования. 2008. № 3. С. 140–150. [Revich B.A. Changing health population in the Russian Federation in conditions climate change. *Problemy prognozirovaniia = Problems of Forecasting, 2008, no. 3, pp. 140–150. (In Russ.)*]
15. Тохов Ю.М., Чумакова И.В., Луцук С.Н., Дьяченко Ю.В., Котенев Е.С., Зайцев А.А. Иксодовые клещи — резервуар возбудителей инфекционных и инвазионных болезней на территории Ставропольского края // Вестник ветеринарии. 2013. № 2. С. 19–21. [Tokhov Yu.M., Chumakova I.V., Lutsuk S.N., Dyachenko Yu.V., Kotenev E.S., Zaitsev A.A. Ticks as the reservoir of contagious diseases in the Stavropol territory. *Vestnik veterinarii = Newsletter of Veterinary Science, 2013, no. 2, pp. 19–21. (In Russ.)*]
16. Трухачев В.И., Тохов Ю.М., Луцук С.Н., Дылев А.А., Толоконников В.П., Дьяченко Ю.В. Распространение и экологическая характеристика иксодовых клещей рода *Hyalomma* в экосистемах Ставропольского края // Юг России: экология, развитие. 2016. Т. 11, № 2. С. 59–69. [Trukhachev V.I., Tokhov Yu.M., Lutsuk S.N., Dylev A.A., Tolokonnikov V.P., Dyachenko Yu.V. Distribution and ecological characteristics of *Hyalomma* ixodid ticks in the ecosystems of the Stavropol region. *Iug Rossii: ekologiya, razvitie = South of Russia: Ecology, Development, 2016, vol. 11, no. 2, pp. 59–69. doi: 10.18470/1992-1098-2016-2-59-69 (In Russ.)*]
17. Ястребов В.К., Рудаков Н.В., Шпынов С.Н. Трансмиссивные клещевые природно-очаговые инфекции в Российской Федерации: тенденции эпидемического процесса, актуальные вопросы профилактики // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). 2012. № 4. С. 91–93. [Yastrebov V.K., Rudakov N.V., Shpynov S.N. Transmissible tick-borne natural focal infections in the Russian Federation: trends of the epidemiological process, actual prophylaxis problems. *Sibirskii meditsinskii zhurnal (Irkutsk) = Siberian Medical Journal (Irkutsk), 2012, no. 4, pp. 91–93. (In Russ.)*]
18. Ясюкевич В.В., Титкина С.Н., Попов И.О., Давидович Е.А., Ясюкевич Н.В. Климатозависимые заболевания и членистоногие переносчики: возможное влияние наблюдаемого на территории России изменения климата. Проблемы экологического мониторинга и моделирования экосистем. М.: ИГКЭ, 2013. Т. 25. С. 314–359. [Yasjukevich V.V., Titkina S.N., Popov I.O., Davidovich E.A., Yasjukevich N.V. Climate-dependant diseases and arthropod vectors: possible influence of climate change observed in Russia. In: Problems of ecological monitoring and ecosystem modelling. *Moscow: IGKE, 2013, vol. 25, pp. 314–359. (In Russ.)*]
19. Githeko A.K., Lindsay S.W., Confalonieri U.E., Patz J.A. Climate change and vector-borne diseases: a regional analysis. *Bull. World Health Organ., 2000, vol. 78, no. 9, pp. 1136–1147.*

20. Kovats R.S., Campbell-Lendrum D.H., McMichael A.J., Woodward A, CoxEarly J.S. Early effects of climate change: do they include changes in vector-borne disease? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 2001, vol. 29, no. 356 (1411), pp. 1057–1068. doi:10.1098/rstb2001.0894
21. Mills J.N., Gage K.L., Khan A.S. Potential influence of climate change on vector-borne and zoonotic diseases: a review and proposed research plan. *Environ. Health Perspect.*, 2010, vol. 118, no. 11, pp. 1507–1514. doi:10.1289/ehp.0901389
22. Stocker, T.F., Qin D., Plattner G.-K., Tignor M., Allen S.K., Boschung J., Nauels A., Xia Y., Bex V., Midgley P.M. Climate change 2013: the physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental. Panel on Climate Change. *IPCC*, 2013, 1535 p.

Авторы:

Куличенко А.Н., член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, директор ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

Прислегина Д.А., врач-инфекционист лаборатории эпидемиологии ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия.

Authors:

Kulichenko A.N., Corresponding Member of RAS, PhD, MD (Medicine), Professor, Director of Stavropol Research Institute of Rospotrebnadzor, Stavropol, Russian Federation;

Prislegina D.A., Infectious Disease Physician, Laboratory of Epidemiology, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russian Federation.

Поступила в редакцию 13.03.2018
Принята к печати 25.02.2019

Received 13.03.2018
Accepted 25.02.2019

ВИРУЛЕНТНОСТЬ *Mycobacterium tuberculosis* ГЕНОТИПА BEIJING В УСЛОВИЯХ *IN VIVO*

Ю.А. Беспятых¹, Т.И. Виноградова², О.А. Маничева², Н.В. Заболотных²,
М.З. Догондзе², М.Л. Витовская², А.С. Гуляев¹, В.Ю. Журавлев²,
Е.А. Шитиков¹, Е.Н. Ильина¹

¹ ФГБУ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия

² ФГБУ Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В структуре популяции возбудителя туберкулеза в России доля штаммов генетического семейства Beijing составляет от 50 до 80%. На основании VNTR- и SNP-анализа представители семейства разделяют на несколько доминирующих кластеров: B0/W148, CladeA и CAO. Следует отметить, что описываемые группы принадлежат к «современным» Beijing и очень близки филогенетически. Как правило, такие изоляты демонстрируют высокую трансмиссивность, ассоциацию с лекарственной устойчивостью и преобладают среди пациентов с тяжелыми формами заболевания. Немногочисленные исследования вирулентности штаммов отдельных кластеров носят противоречивый характер. Целью данной работы было сравнительное исследование вирулентности штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, относящихся к основным кластерам семейства Beijing на животной модели. В исследование включены клинические штаммы, относящиеся к кластерам семейства Beijing B0/W148, CladeA, CAO и некластеризующийся штамм NK, а также лабораторный штамм H37Rv. В ходе исследований по оценке выживаемости инфицированных мышей линии C57BL/6 (по 20 мышей на штамм) было установлено, что наибольшая смертность наблюдалась в группе животных, инфицированных штаммами NK и B0/W148. При этом наименьшей вирулентностью обладал штамм CladeA. Анализ патоморфологической картины экспериментального туберкулеза показал, что все штаммы имели характерные патогенные свойства, то есть были способны вызывать специфический туберкулезный процесс. В ходе оценки динамики патоморфологических изменений (1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 и 120 день после заражения) в легких и селезенке выявлены достоверные различия между штаммами. Прогрессивное развитие туберкулезного процесса наблюдалось у мышей, инфицированных изолятами B0/W148 и NK. В то же время при инфекции штаммами CladeA, CAO и H37Rv наблюдалась стабилизация процесса и менее серьезное повреждение органов. Согласно полученным данным, бактериальная нагрузка после заражения кластеризующимися штаммами семейства Beijing была ниже таковой для штамма H37Rv, который использовался как референсный. Исключением являлся штамм NK, бактериальная нагрузка для которого являлась самой высокой среди семейства Beijing и была сопоставима с H37Rv к 120 дню инфицирования. Показано, что кластер B0/W148, известный как наиболее вирулентный, обладает схожим уровнем вирулентности со штаммом NK. Суммарно, полученные данные свидетельствуют, что штаммы семейства Beijing демонстрируют различный спектр фенотипической вирулентности.

Ключевые слова: туберкулез, вирулентность, *Mycobacterium tuberculosis*, микобактерии, мышинные модели, Beijing B0/W14.

Адрес для переписки:

Беспятых Юлия Андреевна
119435, Россия, Москва, ул. Малая Пироговская, 1а,
ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России.
Тел.: 8 (909) 961-18-46. Факс: 8 (499) 246-44-09.
E-mail: juliabes@rcpcm.org

Contacts:

Julia A. Bespyatykh
119435, Russian Federation, Moscow, Malaya Pirogovskaya str., 1a,
Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine.
Phone: +7 (909) 961-18-46. Fax: +7 (499) 246-44-09.
E-mail: juliabes@rcpcm.org

Библиографическое описание:

Беспятых Ю.А., Виноградова Т.И., Маничева О.А., Заболотных Н.В.,
Догондзе М.З., Витовская М.Л., Гуляев А.С., Журавлев В.Ю.,
Шитиков Е.А., Ильина Е.Н. Вирулентность *Mycobacterium tuberculosis*
генотипа Beijing в условиях *in vivo* // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9,
№ 1. С. 173–182. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-173-182

Citation:

Bespyatykh J.A., Vinogradova T.I., Manicheva O.A., Zabolotnykh N.V.,
Dogonadze M.Z., Vitovskaya M.L., Guliaev A.S., Zhuravlev V.Yu., Shitikov E.A.,
Ilyina E.N. In vivo virulence of Beijing genotype *Mycobacterium tuberculosis* //
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019,
vol. 9, no. 1, pp. 173–182. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-173-182

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ 17-15-01412)

IN VIVO VIRULENCE OF BEIJING GENOTYPE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS**Bespyatykh J.A.^a, Vinogradova T.I.^b, Manicheva O.A.^b, Zabolotnykh N.V.^b, Dogonadze M.Z.^b, Vitovskaya M.L.^b, Guliaev A.S.^a, Zhuravlev V.Yu.^b, Shitikov E.A.^a, Ilina E.N.^a**^a *Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation*^b *St. Petersburg Research Institute of Phthiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation*

Abstract. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains comprise 50–80% in Russian Federation, which are divided into the main B0/W148, CladeA, and CAO clusters based on VNTR and SNP analysis. It should be noted that such phylogenetically highly close MTB strains belong to the modern Beijing family, generally demonstrating high transmissibility, association with drug resistance, and prevalence among patients with severe forms of the disease. However, studies on MTB genetic cluster strain-related virulence are scarce and contradictory. Here, we investigated virulence of diverse *Mycobacterium tuberculosis* strains belonging to the B0/W148, CladeA and CAO clusters and nonclustered strain NK of the Beijing family as well as laboratory strain H37Rv in C57BL/6 mice. It was found that mice infected with NK and B0/W148 vs. CladeA strains revealed the peak and the lowest mortality, respectively, while assessing survival rate in various groups (20 mice per MTB strain examined). Analyzing experimental data in mice demonstrated that all MTB strains were able to cause typical tuberculosis-related pathogenic signs. In particular, time-dependent evaluation of pathological changes (on 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 and 120 day post infection) in the lungs and spleen revealed significant differences among various strains. Tuberculosis progression was observed in the mice infected with B0/W148 and NK strains, whereas CladeA, CAO and H37Rv strains resulted in stabilized course and less marked organs damage. Moreover, we found that bacterial load after infection with Beijing family clustering strains was lower compared to that of the reference H37Rv strain, except NK strain demonstrating the peak bacterial load among the Beijing family comparable to H37Rv strain at 120 dpi. Thus, it was found that the level of virulence between most virulent B0/W148 cluster strain vs. NK strain was similar. Overall, the data obtained indicate that Beijing genotype strains are characterized by a diverse range of phenotypic virulence *in vivo*.

Key words: *tuberculosis, virulence, Mycobacterium tuberculosis, mycobacteria, murine model, Beijing B0/W148*

Введение

В Российской Федерации (РФ) туберкулез остается одной из основных проблем здравоохранения. Несмотря на общую тенденцию к снижению заболеваемости впервые выявленными активными формами туберкулеза, ситуация остается напряженной. В 2017 г. заболеваемость туберкулезом составила 53,3 человек на 100 тыс. населения, а всего за год в РФ было зарегистрировано около 71 тыс. новых случаев заболевания [6].

Стоит отметить, что структура популяции *M. tuberculosis* в России имеет свои особенности. Штаммы семейства Beijing преобладают на территории страны, составляя 50–80% случаев [27]. Для этого генетического семейства доказана строгая ассоциация с формированием лекарственной устойчивости [10, 21, 37] и большая вирулентность по сравнению с другими генотипами [14]. Последнее подтверждается как на уровне макрофагальных моделей, так и на уровне эпидемиологических исследований. В свою очередь повышенная представленность факторов вирулентности продемонстрирована для штаммов семейства Beijing и на молекулярном уровне [29]. При этом стоит отметить, что гипервирулентность не является характерной особенностью семейства, а лишь присуща определенным генетическим сублиниям внутри Beijing, зачастую ассоциированным со вспышками заболеваний в том или ином регионе [10, 17].

Одной из таких сублиний является кластер Beijing B0/W148. По литературным данным кло-

нальная группа составляет около четверти всех изолятов генотипа Beijing, циркулирующих в разных регионах России и бывшего Советского Союза [25]. Представители кластера часто выявляются среди российских иммигрантов в Соединенных Штатах Америки и Европе [5, 10, 13, 19]. В экспериментах на мышинных макрофагальных моделях была показана повышенная вирулентность штаммов Beijing B0/W148 по сравнению с другими вариантами генотипа Beijing [1, 2]. Схожие результаты были продемонстрированы Lasunskaja с соавт. [20] на моноцитоподобной линии клеток ТНР-1. В то же время работы, проведенные на животных моделях, продемонстрировали разнящиеся результаты [3, 4, 7, 30]. Так, на линии белых неинбредных мышей была показана повышенная вирулентность изолятов кластера Beijing B0/W148 по сравнению с другими штаммами семейства [3]. Схожие результаты продемонстрированы в одной из последних работ Ribeiro с соавт., где показана повышенная вирулентность современных Beijing, и в частности Beijing B0/W148, по сравнению с древними [30]. В свою очередь, в работах ЦНИИ туберкулеза была показана неоднородность изолятов генотипа Beijing при исследовании выживаемости инбредной линии мышей C57BL/6 и отсутствие особых вирулентных свойств у Beijing B0/W148 [4, 7].

Другими кластерами, широко распространенными на территории страны, являются CladeA и CAO (Central Asia Outbreak) [12]. Данные кластеры филогенетически близки к Beijing B0/W148

и относятся к «современным» Beijing [23, 33]. Согласно международной базе данных MIRU-VNTRplus, CladeA и CAO относятся к VNTR-типу 94–32. В свою очередь согласно недавнему исследованию большой коллекции VNTR-паттернов генотипа Beijing кластеры принадлежат к группе CC1 [23]. Показано, что для штаммов кластеров характерен высокий уровень устойчивости к противотуберкулезным препаратам [12], однако, какие-либо данные об их вирулентности и трансмиссивности в литературе отсутствуют. Вероятно, это обусловлено тем, что не разработан стандартизованный метод их типирования.

В связи с этим целью данного исследования было сравнительное изучение вирулентных свойств штаммов *M. tuberculosis* семейства Beijing, относящихся к различным кластерам, в условиях *in vivo*.

Материалы и методы

Бактерии. В исследование включено 5 штаммов *M. tuberculosis* из охарактеризованной коллекции СПб НИИФ. Выборка состояла из 4 штаммов семейства Beijing: 1 штамм Clade A, 1 штамм B0/W148, 1 штамм CAO, 1 штамм некластеризующийся (NK). Также в работу был включен референсный лабораторный штамм H37Rv. Культивирование штаммов проводили на среде Левенштейна–Йенсена (Becton, Dickinson and Company, США). Выделение ДНК осуществляли по методу van Embden с соавт. [38].

Бактериологическое исследование культур на чувствительность к противотуберкулезным препаратам 1 и 2 ряда было проведено методом абсолютных концентраций и на приборе Bactec MGIT 960. Обнаружение генетических маркеров ЛУ проводилось с использованием биочипов «ТБ-ТЕСТ» согласно методике производителя.

VNTR-типирование штаммов по 24 локусам генома проводили согласно стандартной методике [35]. Результаты исследования сравнивали с профилями, представленными в международной базе данных MIRU-VNTRplus (www.miru-vntrplus.org).

Животные. В работе были использованы мыши линии C57BL/6, самцы в возрасте двух месяцев к началу инфицирования. Мыши получены из питомника филиала «Андреевка» Научного центра биомедицинских технологий ФМБА (г. Красногорск, Московская область, Россия) и содержались в виварии ФГБУ Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии (СПб НИИФ, Санкт-Петербург, Россия) в соответствии со всеми нормами ухода за животными. Всего в работе было использовано 350 мышей.

Все процедуры с модельными животными были рассмотрены и утверждены локальными этическими комитетами СПб НИИФ (Приказ Минздравсоцразвития РФ № 708н от 23.08.2010)

и ФГБУ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА (ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России) (протокол заседания № 2018/08) на предмет соответствия Правилам лабораторной практики.

Заражение. Микобактериальную суспензию для инфицирования мышей готовили *ex tempore* из трехнедельных штаммов второй генерации. Заражающая доза — 10^6 КОЕ/мышь в 0,2 мл физиологического раствора. Суспензию микобактерий инокулировали модельным животным в латеральную хвостовую вену.

Дизайн эксперимента. Модельные животные были разделены на две группы: 1 — для исследования выживаемости животных, зараженных микобактериями; 2 — для исследования вирулентности штаммов.

Первая группа включала 100 мышей, по 20 особей на каждый изучаемый штамм. Перед введением возбудителей туберкулеза мышей взвешивали 3 раза. После заражения еженедельно проводился мониторинг массы тела (взвешивание) с использованием электронных весов модели Adventurer™ (ОНАУС Corporation, США). Проводилась регистрация даты гибели животных. Погибших в ходе исследования животных подвергали вскрытию с осмотром внутренних органов.

Вторая группа включала 250 мышей, по 50 особей на каждый из 5 изучаемых штаммов *M. tuberculosis*. Животные выводились из эксперимента по 6 особей на 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 и 120 день после заражения для определения биометрических показателей. Эвтаназию модельных животных осуществляли методом цервикальной дислокации. Далее проводилось вскрытие животного и стерильный забор легких и селезенки. Оценку пораженности извлеченных органов проводили визуально, после чего оценивали линейные размеры, снимали биометрические показатели и проводили высеив микобактерий.

Биометрические показатели. Коэффициенты массы органов для легких и селезенки вычисляли, исходя из соотношения массы органа и массы тела животного, и выражали в условных единицах:

$$\text{Коэффициент массы органа} = \frac{\text{масса органа (г)} \times 100}{\text{масса тела животного (г)}}$$

Индекс поражения легких устанавливали по совокупности экссудативных и продуктивных изменений в условных единицах.

Экссудативные изменения:

- легкие воздушны — 0;
- единичные безвоздушные очаги — 0,25;
- легкие безвоздушны на $1/2$ — 0,5;
- легкие безвоздушны на $2/3$ — 0,75;
- легкие безвоздушны на всем протяжении — 1,0.

Продуктивные очаги:

- единичные субмилиарные очаги — 0,5;
- многочисленные (не более 20) — 1,0;

Таблица 1. Характеристики изучаемых штаммов семейства Beijing
Table 1. Characteristics of experimental Beijing family strains

Кластер Cluster	Год Year	Регион Geographic region	24-VNTR*	Профиль резистентности Resistance profile	Антибиотик** (Мутация устойчивости) Antibiotic** (Resistance mutation)												
					STR (RpsL/rfs)	INH (KatG)	RIF (RpoB)	EMB (EmbB)	ETH (EthA)	OFX (GyrA/GyrB)	KAN	CPM	AM (p.eis/rfs)	AM (PncA)	PASK	CS	
CladeA	2010	Санкт-Петербург St. Petersburg	223325153533424682454433	МЛУ MDR	s (-/c517t)	r (S315T)	r (S450L)	s	s	s	s	s	s	s (-/c517t)	r (T135P)	s	s
Clade B0/W148	2010	Новосибирск Novosibirsk	223325173533424672454433	МЛУ MDR	r (K43R/-)	r (S315T)	r (S450L)	r (M306V)	r (TA704T)	s	s	s	s	r (c-10t/-)	r (A171V)	s	s
CAO	2011	Санкт-Петербург St. Petersburg	223325153533424682454433	МЛУ MDR	r (K43R/-)	r (S315T)	r (S450L)	r (M306I)	s	s	s	s	s	s	r (T135P)	s	s
NK	2011	Санкт-Петербург St. Petersburg	223325163533424682454433	МЛУ MDR	r (K43R/-)	r (S315T)	r (S450L)	r	s	s	s	s	s	s	nd	s	s

Примечание. *24 — VNTR: MIRU 2, MIRU 4, MIRU 10, MIRU 16, MIRU 20, MIRU 23, MIRU 26, MIRU 27, MIRU 31, MIRU 39, MIRU 40, ETR A, ETR B, ETR C, QUB 11b, QUB 26, QUB 4156, Mtbub 04, Mtbub 21, Mtbub 29, Mtbub 30, Mtbub 34, Mtbub 39 [24]. **STR — стрептомицин, INH — изониазид, RIF — рифампицин, EMB — этамбутол, ETH — этионамид, OFX — офлоксацин, KAN — канамицин, CPM — капреомидин, AM — амикацин, PASK — пара-аминосалициловая кислота, CS — циклосерин.
Note. **STR — streptomycin, INH — isoniazid, RIF — rifampicin, EMB — ethambutol, ETH — ethionamide, OFL — ofloxacin, KAN — kanamycin, CPM — capreomycin, AM — amikacin, PASK — para-aminosalicylate acid, CS — cycloserine.

- многочисленные субмилиарные (более 20) — 1,5;
- единичные милиарные — 1,75;
- многочисленные сливающиеся субмилиарные и единичные милиарные — 2,0;
- многочисленные милиарные (не более 10) — 2,25;
- многочисленные милиарные, сливающиеся — 2,75;
- появление мелких казеозных некротических фокусов — 3,0;
- обширный казеоз — 4,0;
- сплошное поражение легких — 5,0.

Бактериологическое исследование. Для определения высеваемости микобактерий осуществляли дозированный посев гомогенатов легких (0,1 г) и селезенки (целиком) на плотную яичную среду Левенштейна–Йенсена (Becton Dickinson, США) методом серийных разведений. Количество выросших колоний *M. tuberculosis* учитывали через 4 недели инкубации посевов при +37°C. Массивность роста микобактерий выражали в десятичных логарифмах (lg) от КОЕ на массу легких.

Статистическая обработка. Обработку результатов проводили с использованием пакета программ MS Excel 2010 (Microsoft). Достоверность различий оценили по t-критерию Стьюдента и считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Бактериальные штаммы. Суммарные характеристики включенных в исследование клинических штаммов генетического семейства Beijing приведены в таблице 1. Представленные образцы относились к «современным» Beijing внутри линии 2.2.1 по Coll с соавт. Проведенное VNTR-типирование позволило отнести штамм B0/W148 к типу 100–32, согласно международной базе данных MIRU-VNTRplus (www.miru-vntrplus.org). VNTR-профили штаммов CladeA и CAO не отличались друг от друга и относились к типу 94–32. Профиль некластеризующегося штамма отличался от профиля CladeA и CAO по локусу MIRU 26 и соответствовал типу 1076–32. В свою очередь согласно анализу профилей по 12-локусной системе [28] исследуемые образцы B0/W148, CladeA, CAO и NK относились к типам M11, M2, M2 и M33 соответственно.

Согласно проведенному бактериологическому тестированию все штаммы проявляли множественную лекарственную устойчивость, что в большинстве случаев подтвердилось генетически. В случае некластеризующегося штамма, проявившего фенотипическую резистентность к этамбутолу, наблюдалось несоответствие фенотипических и генетических данных. Известных генетических маркеров устойчивости к данному антибиотику выявлено не было.

Исследования выживаемости животных. На мышах линии C57BL/6 проведена оценка выживаемости животных после заражения клиническими штаммами *M. tuberculosis* (n = 4) и лабораторным штаммом H37Rv. Естественную гибель животных регистрировали с первого по 128 день; кривые смертности в каждой группе мышей представлены на рисунке 1. Гибель мышей, инфицированных штаммами B0/W148, CAO, NK и H37Rv, начиналась с четвертой недели (23–25 дней). В то же время мыши, инфицированные штаммом CladeA, выживали спустя более 4 месяцев (128 дней). К концу наблюдения наибольшая гибель животных была зарегистрирована в группе мышей, зараженных штаммами NK и B0/W148.

Согласно общей оценке экспериментального туберкулеза, на 128 день наиболее тяжелое течение процесса наблюдалось у мышей, зараженных штаммом NK (3,81; $p < 0,05$). Значения индексов поражения легких у мышей, инфицированных штаммами B0/W148 (3,70) и H37Rv (3,69), были одинаковыми, но менее выражены, чем для штамма NK ($p < 0,05$). Соответствующий индекс поражения штаммом CladeA имел наименьшее значение по сравнению с другими исследуемыми штаммами (3,49; $p < 0,05$).

Исследование вирулентности штаммов. Согласно схеме, представленной в разделе «Материалы и методы», проведена сравнительная оценка вирулентности клинических штаммов *M. tuberculosis* (n = 4) и лабораторного штамма H37Rv. Группы мышей линии C57BL/6, инфицированные пятью различными бактериальными культурами, выводили из эксперимента на определенном сроке после заражения, предварительно проводя их взвешивание.

Анализ динамики изменения массы мышей показал, что заражение штаммами CladeA, B0/W148 и CAO не вызывало снижение массы животных, тогда как мыши, зараженные штаммами NK и H37Rv, первоначально набирали вес, а к 120 дню наблюдалось резкое снижение массы (табл. 2).

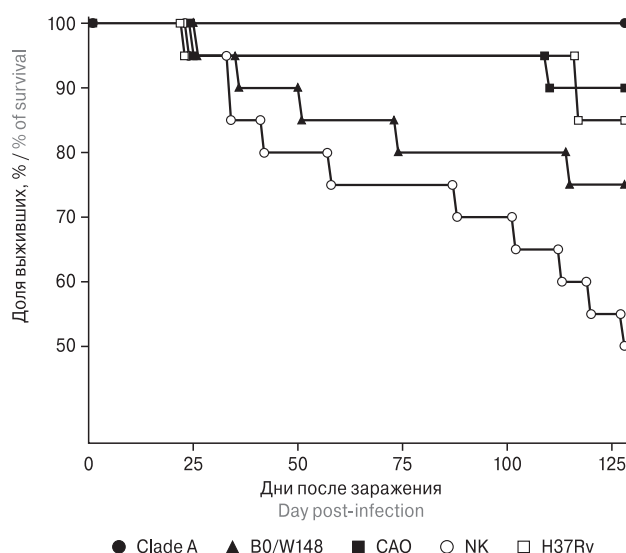


Рисунок 1. Динамика смертности мышей линии C57BL/6, инфицированных исследуемыми штаммами микобактерий

Figure 1. Survival of C57BL/6 mice infected with experimental mycobacterium strains. Mice were evaluated during 128 days post-infection

Примечания. Срок наблюдения — 128 дней. Данные представлены в % к исходному числу мышей в группах наблюдения.

Notes. Data are presented as percentage of mice relative to the baseline assessed in experimental groups

Согласно результатам анализа экссудативных изменений все штаммы вызывали появление единичных безвоздушных очагов в легких начиная с третьего дня после заражения. Данная картина сохранялась без существенных изменений до 120 дня заболевания для штамма B0/W148. В случае заражения штаммом CAO легкие мыши становились безвоздушными на $\frac{1}{2}$ и $\frac{2}{3}$, начиная с 60 дня после заражения. При инфицировании штаммом NK такие же изменения регистрировались с 21 дня, а для штамма CladeA лишь на 120 день. В свою очередь, для штамма H37Rv

Таблица 2. Динамика изменения массы тела у мышей линии C57BL/6 на разных сроках после заражения исследуемыми штаммами *M. tuberculosis*

Table 2. Dynamics of body mass change of the C57BL/6 mice at different days after infection with the *M. tuberculosis* studied strains

Дни после заражения Days after infection	Масса тела мышей, г/Mice body mass, g				
	Штаммы <i>M. tuberculosis</i> /M. tuberculosis strains				
	Clade A	Clade B	Clade C	NK	H37Rv
1	21,4±0,8	22,2±0,6	20,5±0,04	21,1±0,66	19,86±0,48
3	20,4±0,6	21,4±0,8	20,7±0,74	20,6±0,59	19,47±0,55
7	22,4±0,3	22,1±0,8	20,5±0,21	18,3±1,2	20,33±0,64
14	23,0±0,5	22,0±0,9	21,4±0,35	22,2±0,3	20,4±0,66
21	24,5±0,5	23,2±0,7	22,5±0,27	22,4±0,57	21,8±0,44
28	24,5±0,6	26,1±0,4	24,1±0,50	23,8±0,8	22,5±0,66
60	27,4±0,66	25,7±1,21	23,2±0,59	28,1±0,62	25,3±0,87
120	27,3±0,64	28,5±0,82	24,2±0,75	19,7±1,38	22,8±1,17

у части мышей легкие были воздушны до 28 дня, однако на 120 день у всех наблюдались сильные изменения, вплоть до полной безвоздушности легкого.

Продуктивные изменения в легких протекали одинаково в первую неделю развития инфекционного процесса (рис. 2). При этом в случае инфицирования штаммами CladeA, CAO и NK в легких выявлялись многочисленные субмилиарные очаги, а при заражении штаммами B0/

W148 и H37Rv — единичные. В дальнейшем для всех штаммов наблюдалось прогрессирование инфекционного процесса с образованием многочисленных милиарных очагов на 21 день после заражения, которые начинали сливаться к 28 дню.

Наиболее выраженные продуктивные изменения в легких регистрировались в случае инфицирования штаммами B0/W148 и NK. На 60 день было выявлено преобладание казеозных некротических фокусов, а к 120 дню обнаруживались крупные фокусы казеозной пневмонии. У мышей, зараженных штаммами CladeA, CAO и H37Rv, наблюдались менее выраженные некротические изменения в легких. Развитие процесса к 120 дню характеризовалось появлением милиарных сливающихся очагов, а в случае CladeA наблюдалось появление мелких казеозных некротических фокусов.

Высеваемость *M. tuberculosis* из легких зараженных мышей на 21 день достоверно отличалась для всех штаммов (рис. 3). Согласно полученным данным, бактериальная нагрузка увеличивалась до 21 дня и затем сохранялась до 60 дня в случае инфицирования штаммами CladeA и B0/W148, что указывало на временное ингибирующее действие приобретенного иммунитета хозяина (мыши), устанавливающегося через 3–4 недели после заражения. В случае заражения штаммами CAO, NK и H37Rv бактериальная нагрузка в легких непрерывно увеличивалась, начиная с 7 дня заражения. При этом бактериальная нагрузка в селезенке для штаммов CAO и H37Rv увеличивалась до 21 дня, а затем снижалась. В свою очередь, для штамма NK бактериальная нагрузка в селезенке также увеличивалась до 21 дня, после чего наблюдалась стабилизация, а затем вновь повышалась к 120 дню заражения. Суммарно максимальная бактериальная нагрузка как в легких, так и в селезенке на терминальной стадии заражения наблюдалась в случае инфицирования штаммами NK и H37Rv.

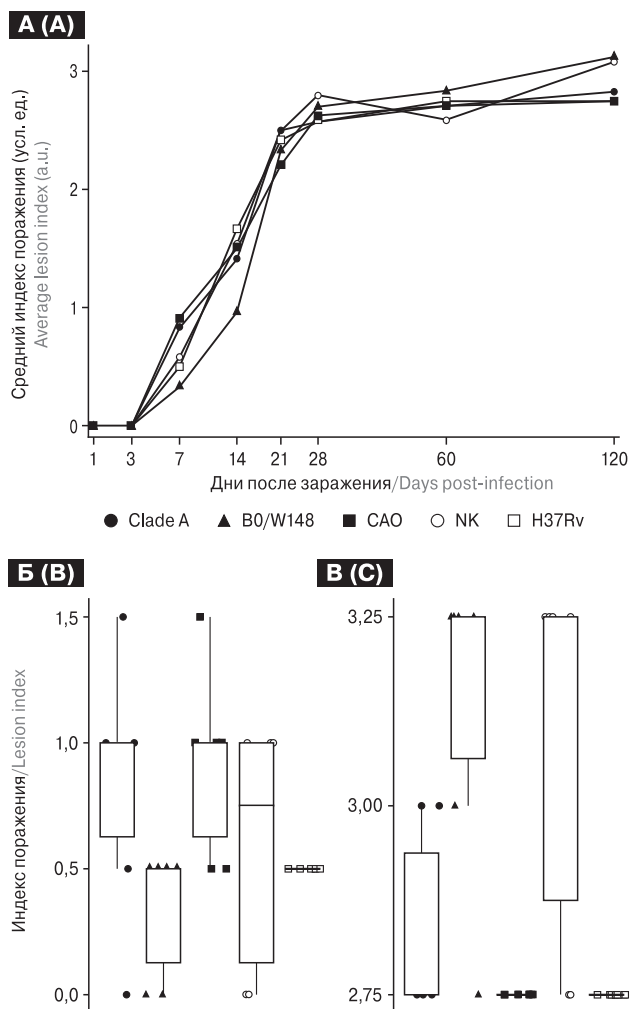


Рисунок 2. Значения индексов продуктивных изменений (условные единицы) легких у мышей линии C57BL/6 после заражения исследуемыми штаммами *M. tuberculosis*

Figure 2. Productive changes index (arbitrary units) in the lungs of C57BL/6 mice infected with *M. tuberculosis* strains

A) Средние значения индексов поражений с первого по 120 день после инфицирования. Значения индексов поражений на Б) 7 день после заражения и В) 120 день после заражения. Каждый символ соответствует значению для одной мыши.

A) Average lesion intensity examined within 1–120 dpi.

B) Average lesion intensity examined on 7 and

C) 120 dpi. Each symbol denotes an individual mouse.

Обсуждение

Впервые представители генотипа Beijing были обнаружены в 90-х гг. XX в., в двух независимых исследованиях, проведенных группами исследователей из Голландии и Америки [10, 39]. При этом название как нельзя лучше отражает реальное место зарождения генотипа. Штаммы генотипа Beijing наиболее часто встречаются в Восточной Азии [25], а также ассоциированы с многочисленными вспышками заболеваний во всем мире, многие из которых были вызваны лекарственно устойчивыми клонами [8, 17]

Как упоминалось ранее, доля Beijing в структуре популяции патогена в России занимает 50–80%. На основании VNTR- и SNP-анализа представители данного генотипа могут быть разделены на несколько превалирующих кластеров:

B0/W148, CladeA и CAO [23, 26, 33, 36]. При этом CladeA и CAO относятся к одному VNTR-типу 94–32 и зачастую объединяются в единый кластер Central Asia [12, 23]. В свою очередь, кластер B0/W148 относится к типу 100–32. Изоляты описываемых групп зачастую демонстрируют высокую трансмиссивность, ассоциацию с лекарственной устойчивостью и преобладают среди пациентов с тяжелыми формами заболевания. При этом работы по исследованию вирулентности штаммов кластеров противоречивы либо совсем отсутствуют.

В исследовании были использованы 3 клинических штамма *M. tuberculosis*, относящиеся к кластерам B0/W148, CladeA и CAO. В работу также вошли лабораторный штамм H37Rv и некластеризующийся штамм НК генотипа Beijing. Последний относился к VNTR-типу 1076–32. Надо отметить, что генетически образец НК принадлежал кластеру Central Asia, но не относился к CladeA и CAO, а также не соответствовал высокотрансмиссивным штаммам.

Включенные в исследование клинические штаммы генотипа Beijing обладали схожим профилем фенотипической и генетической лекарственной устойчивости, что позволило минимизировать диспропорцию в экспериментальных данных, вызванную снижением жизнеспособности лекарственно-устойчивых бактерий. В частности, в модельных экспериментах на морских свинках было продемонстрировано снижение вирулентности у изониазид-устойчивых штаммов [9, 33], схожие закономерности были найдены в случае устойчивости к рифампицину [16, 24], аминогликозидам [15, 34] и фторхинолонам [31].

В ходе исследований по оценке выживаемости было установлено, что наибольшая смертность наблюдалась в группе животных, инфицированных штаммами НК (50%) и B0/W148 (25%) (рис. 1). В то же время все мыши, инфицированные штаммом CladeA, оставались живыми до финального дня эксперимента (128 день), что свидетельствует о наименьшей вирулентности штамма. Анализ распространенности специфического поражения легких у мышей с экспериментальным туберкулезом на 128 день показал, что все штаммы имели характерные патогенные свойства, то есть были способны вызывать туберкулезный процесс. Стоит отметить, что наиболее тяжелое течение заболевания наблюдалось в случае инфицирования штаммом НК, что согласуется с данными летальности. В свою очередь, наименьшие изменения были выявлены в случае заражения штаммами CladeA и CAO. Тяжесть течения экспериментального туберкулеза при заражении штаммами B0/W148 и H37Rv была несколько ниже, чем в случае НК, за счет меньшей выраженности некротических процессов в легких мышей. Полученные результаты разнятся с ис-

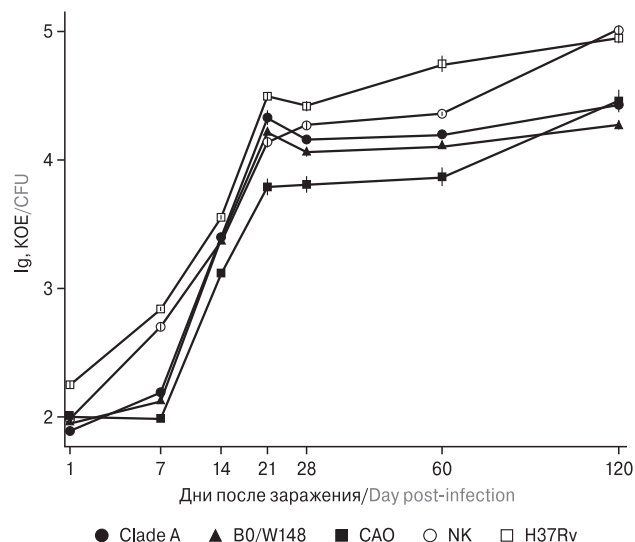


Рисунок 3. Динамика обсемененности (lg числа КОЕ) легких у мышей линии C57BL/6 на разных сроках после заражения исследуемыми штаммами *M. tuberculosis*

Figure 3. Time-dependent lung bacterial burden in C57BL/6 mice infected with *M. tuberculosis* strains

следованием Ribeiro с соавторами, согласно которому штамм H37Rv обладал наименьшими вирулентными свойствами по отношению к представителям генотипа Beijing и не вызывал столь значительных патологических изменений [30]. Объяснением может служить тот факт, что в исследованиях различных лабораторий могут использоваться субпопуляции референсного штамма, немного отличающиеся генетически, и, как следствие, фенотипически [11, 32].

Оценка динамики развития очагов специфического воспаления в легких также выявила различия между штаммами. Прогрессивное развитие туберкулезного процесса наблюдалось у мышей, инфицированных изолятами B0/W148 и НК. Через 60 дней после заражения штаммами были выявлены многочисленные милиарные сливающиеся очаги. К 120 дню крупные фокусы казеозной пневмонии, сливаясь, занимали целые доли легкого. В то же время при инфицировании штаммами CladeA, CAO и H37Rv наблюдалась стабилизация процесса и менее выраженное повреждение органов.

Согласно полученным данным, бактериальная нагрузка после заражения кластеризующимися штаммами семейства Beijing была ниже таковой для штамма H37Rv, который использовался как референсный. Исключением являлся штамм НК, бактериальная нагрузка для которого являлась самой высокой среди семейства Beijing и была сопоставима с H37Rv к 120 дню инфицирования. Следует отметить, что обсемененность легких была наименьшей в случае с B0/W148. При этом высеваемость данного штамма из органов мыши была стабильной с 21

по 120 день инфицирования. Принимая во внимание высокую летальность мышей, прогрессирование и тяжесть инфекции, можно сделать предположение, что высокая вирулентность B0/W148 обусловлена в большей степени способностью штамма вызывать патологические изменения в органах и тканях, чем нарастанием бактериальной нагрузки.

Таким образом, результаты экспериментов *in vivo* показали, что штаммы семейства Beijing различаются между собой и могут быть как более, так и менее вирулентными, чем лабораторный штамм H37Rv. При этом, к нашему удивлению, наибольшую вирулентность продемонстрировал штамм НК, по литературным данным относящийся к нетрансмиссивным штаммам. Полученный результат разнится с исследованиями зарубежных коллег [8, 18, 22], в которых показана высокая вирулентность трансмиссивных штаммов по отношению к спорадическим. В свою очередь, в исследовании Ribeiro с соавт. [30] было показано, что некоторые штаммы Beijing из стран с низкой встречаемостью гено-

типа могут демонстрировать вирулентные свойства, схожие с эндемичными высокотрансмиссивными штаммами того же семейства.

Заключение

Представленное исследование подтверждает, что штаммы генотипа Beijing демонстрируют различный спектр фенотипической вирулентности. Последнее свидетельствует о том, что в разных субпопуляциях могут существовать как более, так и менее трансмиссивные штаммы. Более того, нами показано, что кластер B0/W148, известный как наиболее вирулентный, обладает схожим уровнем вирулентности со штаммом НК. В то же время механизмы, за счет которых штаммами реализуется различный уровень вирулентности и трансмиссивности, не до конца расшифрованы. В связи с этим необходимы дальнейшие сравнительные геномные, протеомные и транскриптомные исследования, которые позволят объяснить механизмы, лежащие в основе наблюдаемых различий.

Список литературы/References

1. Андреевская С.Н., Черноусова Л.Н., Смирнова Т.Г., Ларионова Е.Е., Кузьмин А.В. Влияние генотипа *M. tuberculosis* на выживаемость мышей при экспериментальном туберкулезе // Проблемы туберкулеза и болезней легких. 2007. Т. 84, № 7. С. 45–50. [Andreevskaya S.N., Chernousova L.N., Smirnova T.G., Larionova E.E., Kuz'min A.V. Impact of *Mycobacterium tuberculosis* genotype on survival in mice with experimental tuberculosis. *Problemy tuberkuleza i boleznei legkikh = Problems of Tuberculosis and Lung Disease*, 2007, vol. 84, no. 7, pp. 45–50. (In Russ.)]
2. Андреевская С.Н., Черноусова Л.Н., Смирнова Т.Г., Ларионова Е.Е., Кузьмин А.В. Изучение *ex vivo* роста в макрофагах штаммов разных генотипических кластеров // Проблемы туберкулеза и болезней легких. 2006. Т. 83, № 12. С. 43–48. [Andreevskaya S.N., Chernousova L.N., Smirnova T.G., Larionova E.E., Kuz'min A.V. Examining the *ex vivo* growth in the macrophages of *Mycobacterium tuberculosis* of various genotypic clusters. *Problemy tuberkuleza i boleznei legkikh = Problems of Tuberculosis and Lung Disease*, 2006, vol. 83, no. 12, pp. 43–48. (In Russ.)]
3. Вишневецкий Б.И., Нарвская О.В., Васильева С.Н., Сапожникова Н.В., Мокроусов И.В., Оттен Т.Ф. Вирулентность микобактерий туберкулеза // Проблемы туберкулеза. 2002. Т. 79, № 10. С. 33–36. [Vishnevskiy B., Narvskaya O.V., Vasil'eva S.N., Sapozhnikova N.V., Mukrousov I.V., Otten T.F. Virulence of *Mycobacteria tuberculosis*. *Problemy tuberkuleza = Problems of Tuberculosis*, 2002, vol. 79, no. 10, pp. 33–36. (In Russ.)]
4. Земскова З.С., Андреевская С.Н., Смирнова Т.Г., Ларионова Е.Е., Черноусова Л.Н. Экспериментальный туберкулез, вызванный штаммами *M. tuberculosis* генотипических кластеров W, AI и HD. Туберкулез и болезни легких. 2010. Т. 87, № 3. С. 41–46. [Zemskova Z.S., Andreyevskaya S.N., Smirnova T.G., Larionova Y.Y., Chernousova L.N. Experimental tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis* strains of genotypical W, AI, and HD clusters. *Tuberkulez i bolezni legkih = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2010, vol. 87, no. 3, pp. 41–46. (In Russ.)]
5. Нарвская О.В., Мокроусов И.В., Оттен Т.Ф., Вишневецкий Б.И. Генетическое маркирование полирезистентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных на Северо-Западе России // Проблемы туберкулеза. 1999. Т. 79, № 3. С. 39. [Narvskaya O.V., Mukrousov I.V., Otten T.F., Vishnevskiy B.I. Genetic labeling of *Mycobacterium tuberculosis* poliresistant strains isolated in North-West Russia. *Problemy tuberkuleza = Problems of Tuberculosis*, 1999, vol. 79, no. 3, p. 39. (In Russ.)]
6. Нечаева О.Б. Основные показатели по туберкулезу в Российской Федерации. 2017. [Nechaeva O.B. The main indicators for tuberculosis in the Russian Federation. 2017. (In Russ.)]
7. Черноусова Л.Н., Андреевская С.Н., Смирнова Т.Г., Земскова З.С., Ларионова Е.Е. Биологические свойства штаммов *M. tuberculosis* кластера W // Проблемы туберкулеза и болезней легких. 2008. Т. 85, № 10. С. 45–50. [Chernousova L.N., Andreevskaya S.N., Smirnova T.G., Zemskova Z.S., Larionova E.E. Biological properties of *Mycobacterium tuberculosis* W cluster strains. *Problemy tuberkuleza i boleznei legkikh = Problems of Tuberculosis and Lung Disease*, 2008, vol. 85, no. 10, pp. 45–50. (In Russ.)]
8. Aguilar L.D., Hanekom M., Mata D., Gey van Pittius N.C., van Helden P.D., Warren R.M., Hernandez-Pando R. *Mycobacterium tuberculosis* strains with the Beijing genotype demonstrate variability in virulence associated with transmission. *Tuberculosis*, 2010, vol. 90, no. 5, pp. 319–325.
9. Barnett M., Busby S.R., Mitchison D.A. Tubercle bacilli resistant to isoniazid: virulence and response to treatment with isoniazid in guinea-pigs and mice. *Br. J. Exp. Pathol.*, 1953, vol. 34, no. 5, pp. 568–81.
10. Bifani P.J., Mathema B., Kurepina N.E., Kreiswirth B.N. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. *Trends Microbiol.*, 2002, vol. 10, no. 1, pp. 45–52.

11. Borrell S., Gagneux S. Strain diversity, epistasis and the evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2011, vol. 17, no. 6, pp. 815–820.
12. Casali N., Nikolayevskyy V., Balabanova Y., Harris S.R., Ignatyeva O., Kontsevaya I., Corander J., Bryant J., Parkhill J., Nejentsev S., Horstmann R.D., Brown T., Drobniewski F. Evolution and transmission of drug-resistant tuberculosis in a Russian population. *Nat. Genet.*, 2014, vol. 46, no. 3, pp. 279–286.
13. Cox H.S., Kubica T., Doshetov D., Kebede Y., Rüsç-Gerdess S., Niemann S. The Beijing genotype and drug resistant tuberculosis in the Aral Sea region of Central Asia. *Respir. Res.*, 2005, vol. 6, no. 1, p. 134.
14. Dormans J., Burger M., Aguilar D., Hernandez-Pando R., Kremer K., Roholl P., Arend S.M., van Soolingen D. Correlation of virulence, lung pathology, bacterial load and delayed type hypersensitivity responses after infection with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in a BALB/c mouse model. *Clin. Exp. Immunol.*, 2004, vol. 137, no. 3, pp. 460–468.
15. Freihofer P., Akbergenov R., Teo Y., Juskeviciene R., Andersson D.I., Böttger E.C. Nonmutational compensation of the fitness cost of antibiotic resistance in mycobacteria by overexpression of tlyA rRNA methylase. *RNA*, 2016, vol. 22, no. 12, pp. 1836–1843.
16. Gagneux S., Long C.D., Small P.M., Van T., Schoolnik G.K., Bohannan B.J. The competitive cost of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 2006, vol. 312, no. 5782, pp. 1944–1946.
17. Hanekom M., Gey van Pittius N.C., McEvoy C., Victor T.C., Van Helden P.D., Warren R.M. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: a template for success. *Tuberculosis*, 2011, vol. 91, no. 6, pp. 510–523.
18. Kozak R.A., Alexander D.C., Liao R., Sherman D.R., Behr M.A. Region of difference 2 contributes to virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.*, 2011, vol. 79, no. 1, pp. 59–66.
19. Kubica T., Rüsç-Gerdess S., Niemann S. The Beijing genotype is emerging among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Germany. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2004, vol. 8, no. 9, pp. 1107–13.
20. Lasunskaja E., Ribeiro S.C.M., Manicheva O., Gomes L.L., Suffys P.N., Mokrousov I., Ferrazoli L., Andrade M.R.M., Kritski A., Otten T., Kipnis T.L., da Silva W.D., Vishnevsky B., Oliveira M.M., Gomes H.M., Baptista I.F., Narvskaya O. Emerging multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype circulating in Russia express a pattern of biological properties associated with enhanced virulence. *Microbes Infect.*, 2010, vol. 12, no. 6, pp. 467–475.
21. Lipin M.Y., Stepanshina V.N., Shemyakin I.G., Shinnick T.M., Association of specific mutations in katG, rpoB, rpsL and rrs genes with spoligotypes of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Russia. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2007, vol. 13, no. 6, pp. 620–626.
22. Marquina-Castillo B., García-García L., Ponce-de-León A., Jimenez-Corona M.-E., Bobadilla-del Valle M., Cano-Arellano B., Canizales-Quintero S., Martínez-Gamboa A., Kato-Maeda M., Robertson B., Young D., Small P., Schoolnik G., Sifuentes-Osornio J., Hernandez-Pando R. Virulence, immunopathology and transmissibility of selected strains of *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model. *Immunology*, 2009, vol. 128, no. 1, pp. 123–133.
23. Merker M., Blin C., Mona S., Duforet-Frebourg N., Lecher S., Willery E., Blum M.G., Rüsç-Gerdess S., Mokrousov I., Aleksic E., Allix-Béguec C., Antierens A., Augustynowicz-Kopec E., Ballif M., Barletta F., Beck H.P., Barry C.E., Bonnet M., Borroni E., Campos-Herrero I., Cirillo D., Cox H., Crowe S., Crudu V., Diel R., Drobniewski F., Fauville-Dufaux M., Gagneux S., Ghebremichael S., Hanekom M., Hoffner S., Jiao W.W., Kalon S., Kohl T.A., Kontsevaya I., Lillebæk T., Maeda S., Nikolayevskyy V., Rasmussen M., Rastogi N., Samper S., Sanchez-Padilla E., Savic B., Shamputa I.C., Shen A., Sng L.H., Stakenas P., Toit K., Varaine F., Vukovic D., Wahl C., Warren R., Supply P., Niemann S., Wirth T. Evolutionary history and global spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage. *Nat. Genet.*, 2015, vol. 47, no. 3, pp. 242–249.
24. Middlebrook G., Cohn M.L. Some observations on the pathogenicity of isoniazid-resistant variants of tubercle bacilli. *Science*, 1953, vol. 118, no. 3063, pp. 297–299.
25. Mokrousov I. Insights into the origin, emergence, and current spread of a successful Russian clone of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2013, vol. 26, no. 2, pp. 342–360.
26. Mokrousov I., Narvskaya O., Vyazovaya A., Millet J., Otten T., Vishnevsky B., Rastogi N. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype in Russia: in search of informative variable-number tandem-repeat loci. *J. Clin. Microbiol.*, 2008, vol. 46, no. 11, pp. 3576–3584.
27. Mokrousov I., Otten T., Vyazovaya A., Limeschenko E., Filipenko M.L., Sola C., Rastogi N., Steklova L., Vyshnevskiy B., Narvskaya O. PCR-based methodology for detecting multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family circulating in Russia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2003, vol. 22, no. 6, pp. 342–348.
28. Mokrousov I., Nash O. *Mycobacterium tuberculosis* phylogeography in the context of human migration and pathogen's pathobiology: insights from Beijing and Ural families. *Tuberculosis*, 2015, vol. 95, pp. 167–176.
29. Pheiffer C., Betts J.C., Flynn H.R., Lukey P.T., van Helden P. Protein expression by a Beijing strain differs from that of another clinical isolate and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology*, 2005, vol. 151, no. 4, pp. 1139–1150.
30. Ribeiro S.C.M., Gomes L.L., Amaral E.P., Andrade M.R.M., Almeida F.M., Rezende A.L., Lanes V.R., Carvalho E.C.Q., Suffys P.N., Mokrousov I., Lasunskaja E.B. *Mycobacterium tuberculosis* strains of the modern sublineage of the Beijing family are more likely to display increased virulence than strains of the ancient sublineage. *J. Clin. Microbiol.*, 2014, vol. 52, no. 7, pp. 2615–2624.
31. Sander P., Springer B., Prammananan T., Sturmfels A., Kappler M., Pletschette M., Böttger E.C. Fitness cost of chromosomal drug resistance-conferring mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, vol. 46, no. 5, pp. 1204–1211.
32. Senaratne R.H., Sidders B., Sequeira P., Saunders G., Dunphy K., Marjanovic O., Reader J.R., Lima P., Chan S., Kendall S., McFadden J., Riley L.W. *Mycobacterium tuberculosis* strains disrupted in mce3 and mce4 operons are attenuated in mice. *J. Med. Microbiol.*, 2008, vol. 57, no. 2, pp. 164–170.
33. Shitikov E., Kolchenko S., Mokrousov I., Bespyatykh J., Ischenko D., Ilina E., Govorun V. Evolutionary pathway analysis and unified classification of East Asian lineage of *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7, no. 1.
34. Song T., Park Y., Shamputa I.C., Seo S., Lee S.Y., Jeon H.S., Choi H., Lee M., Glynn R.J., Barnes S.W., Walker J.R., Batalov S., Yusim K., Feng S., Tung C.S., Theiler J., Via L.E., Boshoff H.I., Murakami K.S., Korber B., Barry C.E., Cho S.N. Fitness costs of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* are amplified under conditions of nutrient starvation and compensated by mutation in the β' subunit of RNA polymerase. *Mol. Microbiol.*, 2014, vol. 91, no. 6, pp. 1106–1119.

35. Supply P., Allix C., Lesjean S., Cardoso-Oelemann M., Rüsche-Gerdes S., Willery E., Savine E., de Haas P., van Deutekom H., Roring S., Bifani P., Kurepina N., Kreiswirth B., Sola C., Rastogi N., Vatin V., Gutierrez M.C., Fauville M., Niemann S., Skuce R., Kremer K., Locht C., van Soolingen D. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, vol. 44, no. 12, pp. 4498–4510.
36. Surikova O.V., Voitech D.S., Kuzmicheva G., Tatkov S.I., Mokrousov I.V., Narvskaya O.V., Rot M.A., van Soolingen D., Filipenko M.L. Efficient differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family from Russia using highly polymorphic VNTR loci. *Eur. J. Epidemiol.*, 2005, vol. 20, no. 11, pp. 963–974.
37. Toungousova O.S., Sandven P., Mariandyshv A.O., Nizovtseva N.I., Bjune G., Caugant D.A. Spread of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype in the Archangel Oblast, Russia. *J. Clin. Microbiol.*, 2002, vol. 40, no. 6, pp. 1930–1937.
38. Van Embden J.D., Cave M.D., Crawford J.T., Dale J.W., Eisenach K.D., Gicquel B., Hermans P., Martin C., McAdam R., Shinnick T.M. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol.*, 1993, vol. 31, no. 2, pp. 406–409.
39. Van Soolingen D., Qian L., de Haas P.E., Douglas J.T., Traore H., Portaels F., Qing H.Z., Enkhsaikan D., Nymadawa P., van Embden J.D. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J. Clin. Microbiol.*, 1995, vol. 33, no. 12, pp. 3234–3238.

Авторы:

Беспятых Ю.А., к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов ФГБУ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины (ФНКЦ ФХМ) ФМБА России, Москва, Россия;

Виноградова Т.И., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФГБУ СПб НИИ фтизиопульмонологии МЗ РФ, координатор направления «Экспериментальный туберкулез и инновационные технологии», Санкт-Петербург, Россия;

Маничева О.А., д.б.н., ведущий научный сотрудник ФГБУ СПб НИИ фтизиопульмонологии Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;

Заболотных Н.В., д.м.н., ведущий научный сотрудник ФГБУ СПб НИИ фтизиопульмонологии Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;

Догондзе М.З., к.б.н., старший научный сотрудник ФГБУ СПб НИИ фтизиопульмонологии Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;

Витовская М.Л., к.м.н., старший научный сотрудник ФГБУ СПб НИИ фтизиопульмонологии Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;

Гуляев А.С. к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Москва, Россия;

Журавлев В.Ю., к.м.н., ведущий научный сотрудник ФГБУ СПб НИИ фтизиопульмонологии Минздрава России, координатор направления «Лабораторная диагностика», Санкт-Петербург, Россия;

Шитиков Е.А., к.б.н., и.о. зав. лабораторией молекулярной генетики микроорганизмов ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Москва, Россия;

Ильина Е.Н., д.б.н., профессор РАН, заместитель директора по научной работе ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Москва, Россия.

Authors:

Bespyatykh J.A., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Molecular Genetics of Microorganisms, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation;

Vinogradova T.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Head Researcher, St. Petersburg State Research Institute of Phthiisopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation;

Manicheva O.A., PhD, MD (Biology), Leading Researcher, St. Petersburg State Research Institute of Phthiisopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation;

Zabolotnykh N.V., PhD, MD (Medicine), Leading Researcher, St. Petersburg State Research Institute of Phthiisopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation;

Dogonadze M.Z., PhD (Biology), Senior Researcher, St. Petersburg State Research Institute of Phthiisopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation;

Vitovskaya M.L., PhD (Medicine), Senior Researcher, St. Petersburg State Research Institute of Phthiisopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation;

Guliaev A.S., PhD (Biology), Junior Researcher, Laboratory of Molecular Genetics of Microorganisms, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation;

Zhuravlev V.Yu., PhD (Medicine), Leading Researcher, St. Petersburg State Research Institute of Phthiisopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation;

Shitikov E.A., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Molecular Genetics of Microorganisms, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation;

Iilina E.N., PhD, MD (Biology), RAS Professor, Deputy Director for Science, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation.

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСА ГЕПАТИТА В У ВИЧ-ПОЗИТИВНЫХ ЛИЦ В ДАЛЬНЕВОСТОЧНОМ РЕГИОНЕ

Е.А. Базыкина^{1,2}, В.Б. Туркутюков¹, О.Е. Троценко², В.О. Котова²,
Л.А. Балахонцева², Л.В. Бутакова², Л.В. Варнавская³, В.В. Фоменко³,
М.А. Чечулина³, А.И. Крапивкин⁴, С.В. Зиньковская⁴, Г.И. Будай⁴,
О.А. Янович⁵, Е.А. Ломакина⁶, З.И. Лукина⁷

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

² ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск, Россия

³ ФКУЗ МЧС 27 ФСИН РФ, г. Хабаровск, Россия

⁴ ГБУЗ Чукотская окружная больница, г. Анадырь, Россия

⁵ ОГКУЗ Центр профилактики и борьбы со СПИД, г. Биробиджан, Россия

⁶ ГБУЗ Сахалинский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД, г. Южно-Сахалинск, Россия

⁷ ГБУЗ Магаданский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД, г. Магадан, Россия

Резюме. Целью настоящей работы стало изучение распространенности манифестного и оккультного вирусного гепатита В (HBV) у ВИЧ-позитивных лиц в Дальневосточном федеральном округе (ДФО), а также изучение молекулярно-эпидемиологической характеристики циркулирующих в регионе штаммов вируса гепатита В. В работе были применены серологический и молекулярно-генетический методы выявления возбудителя HBV с последующим филогенетическим анализом полученных последовательностей. По признаку наличия анти-НВсAg было установлено, что ВИЧ-позитивные пациенты более подвержены риску заражения HBV по сравнению с условно «здоровыми» лицами: 35,02% (ДИ 95: 29,59–40,45%) и 22,22% (ДИ 95: 17,87–26,57%) соответственно. Распространенность маркеров текущей HBV-инфекции среди ВИЧ-позитивных лиц так же оказалась более высокой по сравнению с условно «здоровым» населением — 6,73% (ДИ 95: 3,88–9,58%) и 0,85% (ДИ 95: 0–1,81%) соответственно. При этом, НВсAg-негативная форма при манифестном течении HBV выявлена в 1,01% (ДИ 95: 0–2,15%) случаев среди ВИЧ-позитивных лиц, в то время как среди условно «здорового» населения она определена в 0,28% (ДИ 95: 0–0,84%). Установлена более частая выявляемость серологических маркеров сочетанного инфицирования вирусными гепатитами С и D в группе ВИЧ-HBV-позитивных лиц по сравнению с пациентами с хронической формой HBV, но без ВИЧ-инфекции: показатели инфицированности HCV составили 50% (ДИ 95: 27,46–77,46%) и 4,65% (ДИ 95: 0–10,94%), HDV — 40% (ДИ 95: 17,97–62,03%) и 4,65% (ДИ 95: 0–10,94%), соответственно. Наиболее распространенным генотипом HBV оказался генотип D с превалированием субтипа D2, при этом был зарегистрирован случай инфицирования генотипом С HBV

Адрес для переписки:

Базыкина Елена Анатольевна
680000, Россия, г. Хабаровск, ул. Шевченко, 2,
ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии.
Тел.: 8 (4212) 46-18-55.
E-mail: alyonaf@yandex.ru

Contacts:

Elena A. Bazykina
680000, Russian Federation, Khabarovsk, Shevchenko str., 2,
Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology.
Phone: +7 (4212) 46-18-55.
E-mail: alyonaf@yandex.ru

Библиографическое описание:

Базыкина Е.А., Туркутюков В.Б., Троценко О.Е., Котова В.О.,
Балахонцева Л.А., Бутакова Л.В., Варнавская Л.В., Фоменко В.В.,
Чечулина М.А., Крапивкин А.И., Зиньковская С.В., Будай Г.И., Янович О.А.,
Ломакина Е.А., Лукина З.И. Распространенность и молекулярно-
генетическая характеристика вируса гепатита В у ВИЧ-позитивных лиц
в Дальневосточном регионе // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 1.
С. 183–192. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-183-192

Citation:

Bazykina E.A., Turkutjukov V.B., Trotsenko O.E., Kotova V.O.,
Balakhontseva L.A., Butakova L.V., Varnavskaya L.V., Fomenko V.V.,
Chechulina M.A., Krapivkin A.I., Zinkovskaya S.V., Budai G.I., Yanovich O.A.,
Lomakina E.A., Lukina Z.I. Prevalence and molecular-genetic characteristics
of hepatitis B virus in HIV-positive individuals at the Far Eastern Federal
District // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet,
2019, vol. 9, no. 1, pp. 183–192. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-183-192

(С2). Полученные результаты указывают на необходимость углубленного обследования ВИЧ-положительных пациентов на наличие маркеров парентеральных вирусных гепатитов для снижения риска развития угрожающих жизни осложнений, а также с целью профилактики распространения инфекционных агентов в популяции.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, вирусный гепатит В, молекулярная эпидемиология, сочетанное инфицирование, Дальневосточный федеральный округ, распространенность.

PREVALENCE AND MOLECULAR-GENETIC CHARACTERISTICS OF HEPATITIS B VIRUS IN HIV-POSITIVE INDIVIDUALS AT THE FAR EASTERN FEDERAL DISTRICT

Bazykina E.A.^{a,b}, Turkutuykov V.B.^a, Trotsenko O.E.^b, Kotova V.O.^b, Balakhontseva L.A.^b, Butakova L.V.^b, Varnavskaya L.V.^c, Fomenko V.V.^c, Chechulina M.A.^c, Krapivkin A.I.^d, Zinkovskaya S.V.^d, Budai G.I.^d, Yanovich O.A.^e, Lomakina E.A.^f, Lukina Z.I.^g

^a Pacific State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Vladivostok, Russian Federation

^b Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Khabarovsk, Russian Federation

^c Hospital FGHI primary healthcare unit 27 of the Russian Federation, Khabarovsk, Russian Federation

^d Chukotka Regional Hospital, Anadyr, Russian Federation

^e Center on Prevention and Combat Against AIDS, Birobidzhan, Russian Federation

^f Sakhalin Regional Center on Prevention and Combat Against AIDS, Yuzhno-Sahalinsk, Russian Federation

^g Magadan Region Center on Prevention and Combat Against AIDS, Magadan, Russian Federation

Abstract. Current study was aimed at investigating prevalence of overt and occult hepatitis B infection in HIV-positive individuals as well as molecular-epidemiological characteristics of the circulating hepatitis B virus (HBV) strains in the Far Eastern Federal District (FEFD). A total number of 297 blood serum/plasma samples obtained from HIV-positive patients residing in the FEFD were enrolled in the study. The first control group included 351 blood serum/plasma samples of general population without indication on HIV and HBV-infection that underwent laboratory check up at the Centers for AIDS Prevention and Control. After evaluating the group of HIV-positive patients 20 HIV-HBV positive samples were selected for further detailed analysis. The second control group included 43 patients with chronic hepatitis B. All groups were age and gender-matched. The research included serological and molecular-genetic (real-time PCR, positive for HBV DNA samples underwent clonal sequencing of PCR-amplified HBV P/S gene) assessment of the biological material followed by a phylogenetic analysis of the HBV sequences. Our research revealed that HIV-positive patients are exposed to a higher risk of HBV infection compared to general population enrolled in the study, which is evident from the prevalence of anti-HBcAg antibodies in the groups examined. HIV-positive vs. first control group was positive for anti-HBcAg antibodies at higher rate (35.02%, CI 95: 29.59–40.45% versus 22.22%, CI 95: 17.87–26.57%, $p = 0.0003$). Abundance of ongoing HBV-infection markers was also higher in HIV-positive individuals compared to general population (6.73%, CI 95: 3.88–9.58% versus 0.85%, CI 95: 0–1.81%, $p = 0.0001$, respectively). Should be noted, that HBsAg-negative HBV infection in HIV-positive patient cohort comprised 1.01% (CI 95: 0–2.15%) whereas in general population this index was as low as 0.28% (CI 95: 0–0.84%). Virus hepatitis C and D were revealed at higher rate in HIV-positive individuals compared to patients with HIV-negative chronic HBV infection ($p = 5.84 \times 10^{-7}$ and $p = 0.000001$ respectively). HCV and HDV prevalence rates comprised 50.0% (CI 95: 27.46–77.46%) and 40.0% (CI 95: 17.97–62.03%) in HIV-positive patients. Similar indices in control group were 4.65% (CI 95: 0–10.94%) and 4.65% (CI 95: 0–10.94%), respectively. The phylogenetic analysis of the six isolated HBV sequences showed that the five samples belonged to genotype D, with dominant subtype D2 (verified in 4 cases). Further, HBV genotype C was detected only in one case. The obtained data indicate a necessity for further in-depth diagnostic examination of viral hepatitis in HIV-positive patients to lower a risk of developing life-threatening complications as well as preventing hepatitis spread in human population.

Key words: HIV-infection, viral hepatitis B, molecular epidemiology, coinfection, Far Eastern Federal District, prevalence.

Введение

Вирусный гепатит В (HBV) остается важной проблемой современного здравоохранения. Несмотря на успешное внедрение рекомбинантной вакцины против вируса, ежегодно регистрируются новые случаи острой и хронической HBV-инфекции, обусловленной, в том числе, мутантными возбудителями с измененной

структурой HBsAg, не определяемыми классическими иммунологическими (серологическими) методами [2, 3, 7, 8]. Для заболевания характерны высокий риск формирования цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы, особенно среди пациентов с сочетанной патологией (до 53% среди всех зарегистрированных случаев), в частности, коинфицированных ВИЧ и/или вирусом гепатита С (HCV) [15, 16, 25].

Эпидемиологическая картина HBV-инфекции в различных странах неоднородна. Существуют гиперэндемичные территории, где распространенность HBsAg среди популяции превышает 8%, регионы с промежуточной (от 2 до 8%) и низкой эндемичностью гепатита В. Безусловно, данные показатели напрямую связаны с доступностью вакцин против HBV, которые значительно снижают риск инфицирования вирусом. Так, например, страны с низким уровнем дохода, которые не имеют возможности проводить крупномасштабные вакцинации в стране, а также страны с труднодоступными территориями имеют высокие уровни заболеваемости и распространенности HBV-инфекции. Африканский континент в целом считается гиперэндемичным регионом, высокая распространенность HBsAg, иногда превышающая 20% среди населения, зарегистрирована в Нигерии, Намибии, Габоне, Камеруне, Буркина-Фасо. Североафриканский регион (Египет, Тунис, Алжир, Марокко) отнесен к низкоэндемичному. В ряде стран континента преобладают средние показатели носительства HBsAg среди населения (2–8%) [27].

Аналогичная ситуация складывается и на территории Южной Америки. Так, контингент условно разделен на территории с низкими (Мексика, Коста-Рика, Уругвай, Аргентина, Чили, Перу, Колумбия), промежуточными (Гватемала, Сальвадор, Гондурас, Доминиканская Республика, Пуэрто-Рико) и высокими (Бразилия, Эквадор, Суринам) показателями носительства HBsAg [25, 27].

Страны Ближнего Востока относятся к регионам с низкой (Ирак, Саудовская Аравия, Иордания) и промежуточной (Объединенные Арабские Эмираты, Кувейт, Йемен) эндемичностью [27].

В ряде стран внедрение вакцинации позволило снизить уровень распространения HBV-инфекции. Например, в Китае в период 1992–2006 гг. отмечено его уменьшение с 9,2 до 7,2% [20]. Средние показатели носительства HBsAg также зарегистрированы в Корее и Сингапуре (около 4%). Аналогичный уровень выявлен и в Казахстане (3,8%) [27].

Страны Восточной Европы, включая Россию, продолжают оставаться регионами с промежуточной эндемичностью HBV-инфекции. В отличие от них государства Западной Европы и Северной Америки характеризуются низкой эндемичностью [25]. Широкомасштабное внедрение вакцинации детей от HBV-инфекции, начатой в данных регионах в 1998 г., привело к значительному снижению заболеваемости гепатитом В и уменьшению в разы доли хронической инфекции среди вакцинированной молодежи по сравнению с невакцинированными

ми сверстниками. При этом, сельские жители остаются более уязвимыми вследствие недостаточного охвата вакцинацией населения в труднодоступных регионах страны [5, 27].

Необходимо отметить, что в Российской Федерации (РФ) на фоне преимущественно промежуточного уровня распространенности HBV-инфекции существуют гиперэндемичные регионы, одним из которых является Республика Саха (Якутия) [11, 12]. Наиболее благоприятная эпидемиологическая обстановка по HBV-инфекции отмечена в административных образованиях Центрального и Южного федеральных округов РФ [10].

Значительный интерес для оценки особенностей эпидемического процесса, совершенствования эпидемиологического надзора и разработки комплекса профилактических мероприятий представляет мониторинг пятой фазы хронической HBV-инфекции, включающий изучение данных о частоте регистрации HBsAg-негативной формы инфекции или латентного (окультного) HBV в популяции [16].

Истинный окультный HBV характеризуется отсутствием HBsAg (подтверждается отрицательным результатом ИФА-анализа в тест-системах с чувствительностью не ниже 0,01 МЕ/мл), как правило, низким уровнем вирусемии в сыворотке крови (менее 200 МЕ/мл), возможным наличием интегрированной сссDNA HBV (ковалентно замкнутой кольцевой ДНК) в гепатоцитах хозяина, а также определением других маркеров (анти-HBc, анти-HBsAg и др.) HBV-инфекции [8, 16].

В 1978 г. J.H. Hoofnagle и соавт. был доказан факт передачи HBV посредством переливания крови при отсутствии HBsAg, но с наличием высоких титров анти-HBcAg [17]. Данный вариант течения HBV-инфекции является актуальным для пациентов с иммуносупрессивными состояниями, например, ВИЧ-инфицированных пациентов, так как ВИЧ способен подавлять репликацию HBV и, как следствие, HBsAg [18, 22, 28]. За счет интерференции между возбудителями ВИЧ-инфекции и HBV распространенность окультного вирусного гепатита В среди ВИЧ-положительных лиц в несколько раз выше по сравнению с общей популяцией [18]. Так, по данным литературы, в группе ВИЧ-положительных пациентов, наряду с отсутствием HBsAg и наличием анти-HBc, ДНК HBV выявлялась с частотой от 10–11,3% [14, 26] до 16,7–31,5% [19, 23] в зависимости от региона проживания. Аналогичные показатели среди доноров варьировали от 0 до 15% [24]. Например, ученые из Китая выявляли ДНК HBV среди условно-здорового населения в 3,3% случаев [28], в то время как в Восточной Нигерии, эндемичной по HBV-инфекции, данный показатель составил 8% [21].

В связи с тем, что в Дальневосточном федеральном округе (ДФО) регистрировались одни из самых высоких в РФ показателей суммарной заболеваемости HBV-инфекцией [10], целью исследования стало изучение распространенности манифестного и оккультного вирусного гепатита В, а также молекулярно-эпидемиологической характеристики генетических вариантов вируса гепатита В, выявленных среди ВИЧ-положительных лиц данного региона России.

Материалы и методы

Проведено исследование 297 образцов сыворотки/плазмы крови ВИЧ-положительных больных, проживающих в ДФО (первая основная группа обследуемых лиц), среди которых мужчины составили 184 человека (61,95%; ДИ 95: 56,42–67,48%), женщины — 113 человек (38,05%; ДИ 95: 32,52–43,58%). Средний возраст обследованных оказался равным 38,62 годам (ДИ 95: 37,44–39,8 лет).

Первая группа сравнения включала сыворотки/плазмы крови 351 пациента с отсутствием данных о наличии хронического вирусного гепатита (ХВГ), проходивших рутинное лабораторное обследование в центрах по профилактике и борьбе со СПИД ДФО (условно «здоровое» население). Мужчины составили 198 человек (56,41%, ДИ 95: 51,22–61,6%), а женщины — 153 человека (43,59%, ДИ 95: 38,4–48,77), средний возраст группы составил 41,47 лет (ДИ 95: 39,38–43,56 лет).

Следовательно, основная группа обследуемых лиц и основная группа сравнения оказались практически сопоставимыми по полу (мужчины составили, соответственно 61,95±2,82% и 56,41±2,65%, $p > 0,05$) и по возрасту (средний возраст в группах соответственно 38,62±2,83 и 41,47±2,63 лет, $p > 0,05$).

В дальнейшем более углубленному серологическому тестированию на маркеры инфицирования вирусами парентеральных гепатитов были подвергнуты 20 ВИЧ-инфицированных пациентов с наличием маркеров текущей HBV-инфекции (HBsAg и/или ДНК HBV), входивших во вторую основную группу обследуемых (группа ВИЧ-HBV-положительных лиц). Группу сравнения для них (вторая группа сравнения) составили 43 пациента с подтвержденным диагнозом ХВГ и с отсутствием у них ВИЧ-инфекции. Средний возраст пациентов второй группы сравнения составил 41,74 лет (ДИ 95: 36,66–46,83 лет), из них преобладали мужчины — 28 человек (65,12%, ДИ 95: 50,87–79,36%), женщин было 15 (34,88%, ДИ 95: 20,64–49,13).

Биологический материал поступал в лабораторию ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиоло-

гии и микробиологии Роспотребнадзора под кодовыми номерами. Исследование проводилось в соответствии с положениями Хельсинской декларации (1975 г.) и было одобрено этическим комитетом ФБГОУ ВО ТГМУ Минздрава России (протокол № 4), пациенты подписывали информированное согласие об участии в исследовании.

Все пробы тестировались на наличие HBsAg (чувствительность метода 0,01 МЕ/мл), антител к HBsAg с использованием наборов производства «Вектор-Бест» (Россия). При обнаружении HBsAg и антител к HBsAg наличие ДНК возбудителя определялось посредством метода ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией (аналитическая чувствительность — 50 МЕ/мл, тест-система «АмплиСенс HBV-FL», ФБУН ЦНИИ эпидемиологии, Россия). При выявлении ДНК HBV проводилось определение вирусной нагрузки (аналитическая чувствительность — 150 МЕ/мл, тест-система «АмплиСенс HBV-Монитор-FL», ФБУН ЦНИИ эпидемиологии, Россия), а также наличия антител к вирусам гепатитов С и D (Вектор-Бест, Россия). ДНК HBV выделяли из 100 мкл плазмы крови с помощью набора реагентов «АмплиПрайм Рибопреп» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии, Россия). Все этапы лабораторной диагностики проводились в соответствии с протоколами фирм-производителей.

Для дальнейшего генотипирования образцов проводилась постановка двухступенчатой ПЦР со специфическими праймерами к участкам S/P генома HBV [6]. Наличие искомого продукта выявляли методом электрофоретической детекции. Для определения нуклеотидных последовательностей использовали метод прямого секвенирования ампликонов на автоматическом генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500. Выравнивание полученных последовательностей проводили в программе BioEdit с помощью интегрированной функции ClustalW. Поиск прототипных штаммов осуществлялся по базе генетических данных GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Филогенетический анализ проводили с помощью пакета программ BEAST 1.10.0, а статистическую достоверность филогенетического дерева проверяли в программе Tracer 1.7.1. (ESS > 200), построение дерева осуществляли в программе FigTree 1.4.3.

Статистический анализ данных включал расчет средних значений, ошибки средней, стандартного отклонения, критерия Стьюдента (двустороннее распределение t), доверительных интервалов, хи-квадрата (χ^2), достоверность различий показателей подтверждалась при вероятности ошибки не более 5% ($p < 0,05$).

Таблица 1. Сравнительная характеристика возрастной структуры ВИЧ-положительного населения ДФО с наличием и отсутствием HBcAg IgG

Table 1. Comparative evaluation of age groups in HBcAg IgG bearing/lacking HIV-positive cohort at the Far Eastern Federal District

Возраст Age	HBcAg IgG положительные пациенты, % HBcAg IgG positive patients, %	HBcAg IgG отрицательные, % HBcAg IgG negative patients, %	Достоверность разницы показателей, p P-value
0–14	0,00±3,85	1,55±0,89	0,69
15–18	0,00±3,85	0,52±0,52	0,89
19–29	0,00±3,85	22,80±3,02	0,000005
30–49	89,42±3,02	61,66±3,50	0,00000001
50–59	6,73±2,46	8,81±2,04	0,52
60–69	3,85±1,89	3,63±1,35	0,92
> 70	0,00±3,85	1,04±0,73	0,79

Результаты

Проведенные исследования позволили установить, что частота выявления анти-HBcAg среди ВИЧ-положительных лиц основной группы наблюдения оказалась довольно высокой, составив 104 из 297 человек или 35,02% (ДИ 95: 29,59–40,45%). В основной группе сравнения данный маркер инфицирования HBV определен у 78 из 351 обследуемого пациента, то есть в меньшем проценте случаев — в 22,22% (ДИ 95: 17,87–26,57%) ($p = 0,0003$).

Анализ распределения ВИЧ-инфицированных лиц первой основной группы наблюдения в зависимости от наличия или отсутствия в сыворотке крови у них анти-HBcAg представлен в таблице 1.

Обращает на себя внимание факт статистически значимо большего удельного веса ВИЧ-инфицированных пациентов с наличием анти-HBc наиболее продуктивного возраста (30–49 лет), нежели доля лиц той же возрастной категории с ВИЧ-инфекцией, но при отсутствии анти-HBc — соответственно 89,42±3,02% и 61,66±3,50%, $p < 0,001$. В целом, ВИЧ-положительные лица с наличием анти-HBcAg оказались несколько старше (средний возраст — 40,9 лет, ДИ 95: 25,31–56,19 лет) по сравнению с ВИЧ-инфицированными лицами без наличия данного серологического маркера (средний возраст — 37,38 лет, ДИ 95: 15,21–59,55 лет, $p = 0,05$).

С учетом того, что наличие анти-HBc в крови человека указывает на факт его контакта с вирусом гепатита В, имеющим однотипные с ВИЧ пути передачи, вполне вероятно, заражение данных пациентов произошло либо одновременно обоими вирусами, либо последовательно в разные промежутки времени. Проникновение вирусов в организм обследуемых лиц могло произойти двумя наиболее распространенными путями — инъекционным и/или половым.

Известно, что начало эпидемии ВИЧ-инфекции в Российской Федерации, имевшее место в 1989 г., напрямую было связано с распространением наркомании. Психотропные вещества, как правило, вводили инъекционным путем [4]. Шприцы использовались многократно, что увеличивало риск распространения гемоконтактных инфекций (парентеральных вирусных гепатитов, ВИЧ-инфекции). На тот момент вакцинация против HBV-инфекции не входила в Национальный календарь профилактических прививок [5].

Последние годы ознаменованы постепенной сменой потребления инъекционных наркотиков на синтетические курительные смеси, «спайсы», что могло повлиять на снижение роли парентерального пути передачи вирусов [13]. Кроме этого, на современном этапе намечена тенденция к преобладанию полового пути передачи ВИЧ-инфекции. Более того, на фоне проводимых в настоящее время крупномасштабных мероприятий по вакцинации против HBV-инфекции значительно снижен риск распространенности вируса гепатита В среди подростков и молодежи. Вполне вероятно, что с этими явлениями связано отсутствие анти-HBc среди охваченных данным наблюдением ВИЧ-инфицированных пациентов в возрасте до 29 лет.

Дальнейшее обследование основной группы наблюдения выявило наличие у 17 из них HBsAg и еще у 3 пациентов — ДНК HBV на фоне положительной реакции на анти-HBc, но при отсутствии HBcAg (вторая группа наблюдения, состоящая из 20 человек). В целом частота обнаружения маркеров текущей HBV-инфекции в основной группе наблюдения, составила 6,73% (20/297; ДИ 95: 3,88–9,58%), что оказалось значительно выше аналогичных показателей основной группы сравнения — 0,85% (3/351, ДИ 95: 0–1,81%, $p = 0,0001$). Следует отметить, что среди ВИЧ-HBV-инфицированных лиц (вторая

группа наблюдения) статистически достоверной разницы между мужчинами ($60,0 \pm 11,24\%$) и женщинами ($40,0 \pm 11,24\%$) не отмечено ($p = 0,22$), хотя по данным литературы преимущество мужчин характерно для HBV-инфекции [2].

HBsAg-негативная форма инфекции, зарегистрированная у трех из 297 ВИЧ-позитивных лиц основной группы наблюдения, составила 1,01% (ДИ 95: 0–2,15%), а в группе условно «здорового» населения выявлен лишь один такой пациент (0,28%, ДИ 95: 0–0,84%, $p = 0,26$).

Следует отметить, что наличие оккультной формы HBV-инфекции подтверждается низкой вирусной нагрузкой (ВН) HBV и отсутствием в сыворотке крови HBsAg. В данном исследовании в 2 из 3 случаев скорее всего имел место оккультный гепатит, так как в этих исследуемых пробах ВН составила менее 150 МЕ/мл при положительном результате качественной ПЦР и отрицательном результате ИФА на HBsAg. У третьего пациента, при недетектируемом уровне HBsAg, выявлены высокие титры антител к HBsAg (более 1000 МЕ/мл), а вирусная нагрузка HBV составила 589 МЕ/мл. Полученные данные о результатах исследования третьего пациента свидетельствовали в пользу присутствия у него мутантного штамма HBV по гену, кодирующему HBsAg (в а-детерминанте). Однако, полученная в ходе секвенирования нуклеотидная последовательность ДНК этого вируса оказалась короткой, вследствие чего участок S-гена оказался нечитаемым, что в конечном итоге не позволило подтвердить предположение о мутантном штамме.

Выявление спектра антител к возбудителям парентеральных вирусных гепатитов D и C (HDV и HCV) показало, что у 8 ($40,0 \pm 11,2\%$) из 20 ВИЧ-инфицированных пациентов с наличием текущей HBV-инфекции были обнаружены антитела, свидетельствующие об их инфицировании HDV. Данный процент, полученный в ходе настоящего исследования, значительно превы-

сил продемонстрированные рядом авторов аналогичные показатели, выявленные среди носителей HBsAg, не инфицированных ВИЧ. Так, по сведениям литературы, частота выявления анти-HDV варьирует в зависимости от региона Российской Федерации и от профиля пациентов. Например, в Республике Саха (Якутия), по праву считающейся эндемичным регионом по HBV- и HDV-инфекции, уровни выявления анти-HDV у лиц с HBV-инфекцией варьировали от 16,6 до 41% [11, 12]. В других субъектах РФ среди пациентов клиники нефрологии, терапии и профессиональных заболеваний они составляли в среднем 18,8% [1].

Более того, антитела к HCV выявлены у 10 из 20 ВИЧ-HBV-коинфицированных лиц, то есть в половине случаев (50%, ДИ 95: 27,46–77,46%), при этом признаки сочетанного инфицирования тремя возбудителями парентеральных вирусных гепатитов (HBV, HCV, HDV) определены у 5 пациентов ($25,0 \pm 9,93\%$).

Следует отметить, что в группе сравнения, представленной 43 пациентами с хронической HBV-инфекцией (без ВИЧ-инфекции), частота выявления антител к HDV- и HCV-инфекции оказалась достоверно ниже (табл. 2).

Дополнительный анализ серологического профиля между данной группой сравнения и 20 пациентами с ВИЧ-HBV коинфекцией показал, что у пациентов с хронической HBV-инфекцией с достоверно большей частотой выявлены антитела к HBeAg, при этом частота выявления HBeAg и анти-HBsAg у них значительно ниже, а случаев инфицирования тремя возбудителями парентеральных вирусных гепатитов, не зарегистрировано.

Более высокий процент выявления HBeAg среди ВИЧ-позитивных лиц с сочетанной HBV-инфекцией, по сравнению с пациентами с хронической формой HBV-инфекции при отсутствии ВИЧ, косвенно свидетельствует о большей степени активности инфекционного

Таблица 2. Сравнительный анализ серологического профиля между ВИЧ-HBV коинфицированными пациентами и пациентами с хронической HBV-инфекцией

Table 2. Comparative analysis of serologic profile in HIV-HBV co-infected vs. chronic HBV infection patients

Формы инфекции Forms of infection	Серологические маркеры инфицирования вирусами гепатитов Serological markers of viral hepatitis				
	HBsAg антитела, % HBsAg antibodies, %	HBeAg, %	HBeAg IgG, %	HDV IgG, %	HCV антитела, % HCV antibodies, %
Хроническая HBV-инфекция Chronic HBV-infection	9,3±4,43	2,33±2,3	97,67±2,3	4,65±3,21	4,65±3,21
ВИЧ-HBV коинфекция HIV-HBV coinfection	25±9,93	5,0±5,0	85±8,19	40,0±11,24	50,0 ±11,5
χ^2	24,58	245,45	1342,17	24,96448	24,0
p	7×10^{-7}	$2,55 \times 10^{-55}$	$7,75 \times 10^{-294}$	$5,84 \times 10^{-7}$	0,000001

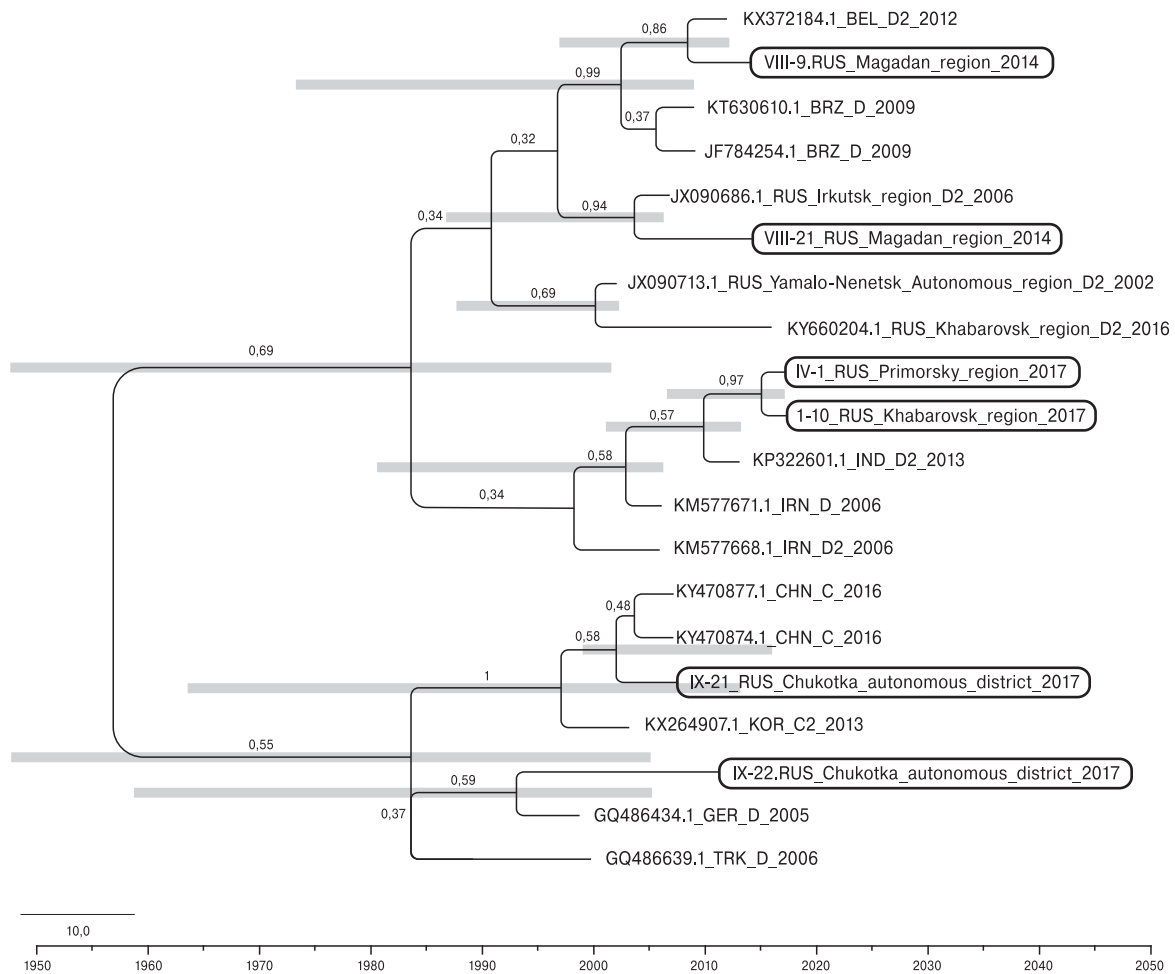


Рисунок. Филогенетическое дерево изолятов HBV, полученных от ВИЧ-HBV-инфицированных лиц ДФО

Figure. Phylogenetic tree of the HIV-isolates obtained from HIV-HBV co-infected individuals at the Far Eastern Federal District

Примечание. Полученные в работе штаммы выделены черной рамкой; горизонтальные серые линии показывают статистически значимые ветви с 95% распределением временного показателя.

Note. Strains obtained in the study were denoted in a black box; grey lines depict significant branches (CI 95%).

процесса у ВИЧ-положительных лиц. Однако статистически достоверной разницы между уровнями вирусной нагрузки HBV среди пациентов с хронической формой HBV-инфекции и ВИЧ-HBV коинфицированными лицами не выявлено ($13104,44 \pm 42002,89$ и $10000170,75 \pm 3077876,67$ ME/мл, $p = 0,1$).

Показатели выявления сочетанного заражения HDV и HCV, значительно превышающие у ВИЧ-HBV-инфицированных лиц (в 8,6 и 10,24 раз соответственно), указывают на целесообразность тщательного обследования ВИЧ-положительных пациентов на наличие маркеров инфицирования вирусными гепатитами. Данная мера продиктована необходимостью своевременной корректировки получаемой терапии и назначением наиболее эффективных препаратов, подавляющих репликацию вирусов.

Углубленному молекулярно-генетическому исследованию подвергнуты 17 нуклеотидных

последовательностей ДНК HBV-положительных проб ВИЧ-инфицированных пациентов. После постановки ПЦР с типоспецифическими праймерами к S/P региону генома HBV и дальнейшего секвенирования удалось изолировать 6 образцов, для которых проведен филогенетический анализ (рис. 1).

С референсными последовательностями генотипа D HBV, наиболее распространенного на территории России [26, 28], кластеризовались 5 из 6 изолированных нами штаммов, четыре из которых относились к субгенотипу D2, а пятую последовательность генотипа D отнести к определенному субгенотипу не удалось. Две последовательности, полученные от пациентов из Магаданской области, отнесенные нами к субгенотипу D2, оказались в большей степени сходными с изолятами из Бельгии (2012 г.), Иркутской области (2006 г.), в меньшей степени — с бразильскими штаммами (2009 г.). Два

изолята HBV от двух больных из Хабаровского и Приморского краев, выделенные в ходе исследования и определенные нами как субгенотипы D2, образовали монофилетическую группу, наиболее сходную со штаммом из Индии (2013 г.). Пятая последовательность от больного из Чукотского автономного округа (ЧАО), отнесенная нами к неопределенному субгенотипу D, кластеризовалась со штаммами из Германии (2005) и Турции (2006).

Лишь 1 из 6 проб, выделенная от пациента из ЧАО, была отнесена к генотипу С HBV, предположительно субгенотипу С2, имевшему сходство с штаммами из Китая (2016) и Кореи (2013). Выявление в ЧАО данного генотипа, для которого не характерно широкое распространение в РФ, возможно, связано с трансграничной его импортиацией, в особенности из Азиатских стран (Китай, Японии, Кореи), где генотип С HBV является доминирующим [25, 27].

Заключение

Полученные в ходе наблюдения данные свидетельствуют о более широком распространении HBV-инфекции, в том числе сочетанных форм с HCV и HDV, среди ВИЧ-положительных лиц Дальневосточного федерального округа, по сравнению с условно «здоровым» населением.

Отмеченная в данном исследовании низкая выявляемость HBsAg и отсутствие анти-HBsAg в группе ВИЧ-положительных лиц в возрасте до 29 лет может быть вероятным результатом эффективности широкомасштабной вакцинопрофилактики среди молодых людей, проводимой в последние годы в нашей стране, а также результативности просветительской работы, направленной на предупреждение распространения HBV-инфекции среди населения.

Среди охваченных наблюдением ВИЧ-инфицированных пациентов ДФО в 1% случаев зарегистрирована HBsAg-негативная форма HBV-

инфекции, в том числе с наличием признаков оккультного вирусного гепатита В, характерного для лиц с иммунодепрессивными состояниями. Необходимо отметить, что выявление HBsAg-негативной формы HBV-инфекции возможно лишь благодаря комплексному применению серологических и молекулярно-генетических методов в диагностике.

Результаты проведенного исследования указывают на целесообразность проведения тщательного обследования ВИЧ-положительных граждан на наличие маркеров инфицирования парентеральными вирусными гепатитами, как серологическими, так и молекулярно-генетическими методами, что, бесспорно, необходимо для выбора тактики лечения пациентов, своевременной профилактики возможных осложнений и предотвращения дальнейшего распространения возбудителей в популяцию.

Филогенетический анализ последовательностей HBV у ВИЧ-инфицированных больных ДФО показал превалирование у них генотипа D HBV, преимущественно субгенотипа D2. Выявление в единичном случае нехарактерного для России генотипа С HBV может указывать на его завоз в результате активных трансграничных связей с близлежащими странами (Китай, Южная Корея, Япония и др.). Отмеченный факт еще раз подчеркивает актуальность использования молекулярно-генетических методов в этиологической расшифровке HBV-инфекции, в том числе при подозрении на завозные случаи инфицирования.

Благодарности

Выражаем благодарность руководителю и сотрудникам филиала «Больница ФКУЗ МСЧ 27» России Варнавской Л.В., Фоменко В.В. и Чечулиной М.А. за помощь в организации сбора биологического материала от ВИЧ-положительных пациентов.

Список литературы/References

1. Абдурахманов Д.Т. Хронический гепатит дельта: клинико-морфологическая характеристика, течение и исходы // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2004. № 4 (вып. 14). С. 14–17. [Abdurakhmanov D.T. Chronic hepatitis Delta: clinical-morphological characteristics, natural history and outcomes. *Rossiiskii zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii = Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*, 2004, no. 4 (iss. 14), pp. 14–17. (In Russ.)]
2. Асратян А.А., Соловьев Д.В., Смирнова О.А., Казарян С.М., Русакова Е.В. Парентеральные вирусные гепатиты и туберкулез: современные проблемы эпидемиологии и профилактики // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2017. № 3. С. 9–14. [Asratyan A.A., Soloviev D.V., Smirnova O.A., Kazaryan S.M., Rusakova E.V. Parenteral viral hepatitis and tuberculosis: current issues of epidemiology and prophylaxis. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktualnie voprosy = Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items*, 2017, no. 3, pp. 9–14. (In Russ.)]
3. Жукова А.Я. Современные аспекты эпидемиологии острого и хронического гепатита В на территории Алтайского края и Российской Федерации // Инфектология. 2016. № 1 (вып. 1). С. 17–20. [Zhukova A.Ya. Current epidemiological aspects of acute and chronic hepatitis B on the territory of the Altai region and Russian Federation. *Infectologiya = Infectology*, 2016, no. 1 (iss. 1), pp. 17–20. (In Russ.)]

4. Иванов А.Н., Троценко О.Е. ВИЧ-инфекция в Дальневосточном федеральном округе: этапы эпидемии, прогноз на будущее // Дальневосточный медицинский журнал. 2004. № 2. С. 42–47. [Ivanov A.N., Trotsenko O.E. HIV-infection in the Far Eastern Federal District: stages of the epidemic, prognosis for the future. *Dalnevostochniy meditsinskiy zhurnal = Far Eastern Medical Journal*, 2004, no. 2, pp. 42–47. (In Russ.)]
5. Коршунова Г.С., Ежлова Е.Б. Состояние заболеваемости острым гепатитом В в России и итоги выполнения дополнительной иммунизации населения в рамках Приоритетного национального проекта в сфере здравоохранения // Здоровье населения и среда обитания. 2008. № 5. С. 4–7. [Korchunova G.S., Ezhlova E.B. Acute hepatitis B incidence state in Russia and results of additional immunization of population as a part of the Health Care National Priority Project. *Zdorovye naseleniya i sreda obitaniya = Population Health and Life Environment*, 2008, no. 5, pp. 4–7. (In Russ.)]
6. Кожанова Т.В., Исаева О.В., Клущкина В.В., Ооржак Н.Д., Саян Р.М., Алексеева М.Н., Миронова Н.И., Громова Н.И., Знойко О.О., Цыкина М.Н., Ильченко Л.Ю., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Первичная лекарственная резистентность вируса гепатита В к аналогам нуклеоз(т)идов у ВГВ-инфицированных пациентов // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2011. № 18. С. 41–47. [Kozhanova T.V., Isaeva O.V., Klushkina V.V., Oorzhak N.D., Sayan P.M., Alekseeva M.N., Mironova N.I., Gromova N.I., Znoiko O.O., Tsykina M.N., P'chenko L.Yu., Kyuregyan K.K., Mikhailov M.I. Hepatitis B virus primary drug resistance to analogues of nucleot(s)ides in HBV-infected patients. *Dalnevostochnii zhurnal infektsionnoy patologii = Far Eastern Journal of Infectious Pathology*, 2011, no. 18, pp. 41–47. (In Russ.)]
7. Коноплева М.В., Борисова В.Н., Семенов Т.А., Крымский М.А., Соколова М.В., Суслов А.П. Проблемы современной стратегии вакцинации против гепатита В // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2017. Т. 16, № 4. С. 58–63. [Konopleva M.V., Borisova V.N., Semenenko T.A., Krimskii M.A., Sokolova M.V., Suslov A.P. Issues of current vaccination strategy against hepatitis B. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccine Prevention*, 2017, vol. 16, no. 4, pp. 58–63. doi: 10.31631/2073-3046-2017-16-4-58-63 (In Russ.)]
8. Кюрегян К.К., Дьяррассуба А., Михайлов М.И. Лабораторная диагностика вирусных гепатитов // Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение. 2015. № 2 (вып. 11). С. 26–36. [Kyuregyan K.K., Dyarrassuba A., Mikhailov M.I. Laboratory diagnosis of viral hepatitis. *Infektsionnie bolezni: Novosti. Mneniya. Obuchenie = Infectious Diseases: News. Opinions. Education*, 2015, no. 2 (iss. 11), pp. 26–36. (In Russ.)]
9. Останкова Ю.В., Семенов А.В., Буркитбаев Ж.К., Савчук Т.Н., Тотолян А.А. Результаты генотипирования вируса гепатита В у HBsAg-негативных доноров крови в г. Астана, Казахстан // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 4. С. 383–392. [Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Burkitbaev Zh.K., Savchuk T.N., Totolian A.A. Results of hepatitis B virus genotyping in HBsAg-negative blood donors in the Astana, Kazakhstan. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, vol. 7, no. 4, pp. 383–392. doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-383-392 (In Russ.)]
10. Садикова Н.В., Кузин С.Н., Ершова О.Н., Кириллова И.Л., Забелин Н.Н., Кузина Л.Е., Зверева И.К., Зверев В.В. Количественные характеристики эпидемического процесса гепатита В на территории Российской Федерации // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2008. № 5. С. 4–9. [Sadikova N.V., Kuzin S.N., Ershova O.N., Kirillova I.L., Zabelin N.N., Kuzina L.E., Zveryaeva I.K., Zverev V.V. Quantative characteristics of hepatitis B epidemiological process in the Russian Federation. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccine Prevention*, 2008, no. 5, pp. 4–9. (In Russ.)]
11. Слепцов А.П. Вирусный гепатит В в Якутии // Сибирский медицинский журнал. 2007. Т. 22, № S2. С. 52–53. [Sleptsov A.P. Viral hepatitis B in Yakutia. *Sibirskii meditsinskiy zhurnal = Siberian Medical Journal*, 2007, vol. 22, no. S2, pp. 52–53. (In Russ.)]
12. Семенов С.И., Саввин Р.Г., Никитина С.Г., Максимова С.С., Кривошапкин В.Г., Слепцова С.С. Эпидемиологическая ситуация по вирусным гепатитам В в Республике Саха (Якутия) // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2015. № 25 (вып. 4). С. 53–58. [Semenov S.I., Savvin R.G., Nikitina S.G., Maksimova S.S., Krivoshapkin, V.G., Sleptsova S.S. Hepatitis B epidemiological situation in Republic Sakha (Yakutia). *Rossiiskii zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii = Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*, 2015, no. 25 (iss. 4), pp. 53–58. (In Russ.)]
13. Титаренко Р.В. Особенности наркоситуации и проблемы профилактики наркомании среди российских подростков. Гуманитарные, социально-экономические и общественные науки. 2015. № 11. С. 191–194. [Titarenko R.V. Peculiarities of drug abuse situation and drug addiction prophylaxis issue among Russian teenagers. *Gumanitarniye, cotsialno-ekonomicheskie i obshchestvennie nauki = Humanities, Social-Economic and Social Sciences*, 2015, no. 11, pp. 191–194. (In Russ.)]
14. Barth R.E., Huijgen Q., Tempelman H.A., Mudrikova T., Wensing A.M., Hoepelman A.I. Presence of occult HBV, but near absence of active HBV and HCV infections in people infected with HIV in rural South Africa. *J. Med. Virol.*, 2011, no. 83 (6), pp. 929–934. doi: 10.1002/jmv.22026
15. Coppola N., Onorato L., Pisaturo M., Macera M., Sagnelli C., Martini S., Sagnelli E. Role of occult hepatitis B virus infection in chronic hepatitis C. *World J. Gastroenterol.*, 2015, vol. 21, no. 42, pp. 11931–11940. doi: 10.3748/wjg.v21.i42.11931
16. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.*, 2017, vol. 67, pp. 370–398. doi: 10.1016/j.jhep.2017.03.021
17. Hoofnagle J.H., Seeff L.B., Bales Z.B., Zimmerman H.J. Type B hepatitis after transfusion with blood containing antibody to hepatitis B core antigen. *N. Engl. J. Med.*, 1978, no. 298, pp. 1379–1383. doi: 10.1056/NEJM197806222982502
18. Karaosmanoglu H.K., Aydin O.A., Nazlican O. Isolated anti-HBc among HIV-infected patients in Istanbul, Turkey. *HIV Clin. Trials*, 2013, no. 14 (1), pp. 17–20. doi: 10.1410/hct1401-17
19. Laguno M., Larrousse M., Blanco J.L., Leon A., Milinkovic A., Martínez-Rebozler M., Loncá M., Martínez E., Sanchez-Tapias J.M., de Lazzari E., Gatell J.M., Costa J., Mallolas J. Prevalence and clinical relevance of occult hepatitis B in the fibrosis progression and antiviral response to INF therapy in HIV-HCV-coinfected patients. *Spain AIDS Res. Hum. Retrovir.*, 2008, no. 24 (4), pp. 547–553. doi: 10.1089/aid.2007.9994
20. Luo Z., Li L., Ruan B. Impact of the implementation of a vaccination strategy on hepatitis B virus infections in China over a 20-year period. *Int. J. Infect. Dis.*, 2012, no. 16, pp. 82–88. doi: 10.1016/j.ijid.2011.10.009
21. Nna E., Mbamalu C., Ekejindu I. Occult hepatitis B viral infection among blood donors in South-Eastern Nigeria. *Pathog. Glob. Health*, 2014, no. 108 (5), pp. 223–228. doi: 10.1179/2047773214Y.0000000144

22. Opaleye O.O., Oluremi A.S., Atiba A.B., Adewumi M.O., Mabayoje O.V., Donbraye E., Ojurongbe O., Olowe O.A. Occult hepatitis B virus infection among HIV positive patients in Nigeria. *J. Trop. Med.*, 2014, vol. 2014, pp. 1–5. doi: 10.1155/2014/796121
23. Panigrahi R., Majumder S., Goptu M., Biswas A., Datta S., Chandra P.K., Banerjee A., Chakrabarti S., Bandopadhyay D., De B.K., Chakravarty R. Occult HBV infection among anti-HBc positive HIV-infected patients in apex referral centre, Eastern India. *Ann. Hepatol.*, 2012, no. 11 (6), pp. 870–875.
24. Seo D.H., Whang D.H., Song E.Y., Han K.S. Occult hepatitis B virus infection and blood transfusion. *World J. Hepatol.*, 2015, no. 7 (3), pp. 600–606. doi: 10.4254/wjh.v7.i3.600
25. Te H.S., Jensen D.M. Epidemiology of hepatitis B and C viruses: a global overview. *Clin. Liver Dis.*, 2010, no. 14 (1), pp. 1–21. doi: 10.1016/j.cld.2009.11.009
26. Tramuto F., Maida C.M., Colomba G.M., Di Carlo P., Vitale F. Prevalence of occult hepatitis B virus infection in a cohort of HIV-positive patients resident in Sicily, Italy. *Biomed. Res. Int.*, 2013, vol. 2013, pp. 1–7. doi: 10.1155/2013/859583
27. Zampino R., Boemio A., Sagnelli C., Alessio L., Adinolfi L.E., Sagnelli E., Coppola N. Hepatitis B virus burden in developing countries. *World J. Gastroenterol.*, 2015, no. 21 (42), pp. 11941–11953. doi: 10.3748/wjg.v21.i42.11941
28. Zhang R.F., Liu L., Zheng Y.F., Shen Y.Z., Chen J., Gu S.M., Wang J.R., Lu H.Z. Epidemiological and clinical features of occult hepatitis B in HIV infection without antiretroviral treatment. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, 2013, no. 21 (3), pp. 189–191.

Авторы:

Базыкина Е.А., аспирант кафедры эпидемиологии и военной эпидемиологии ФГБОУ ВО Тихоокеанский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Владивосток, Россия; младший научный сотрудник лаборатории эпидемиологии и профилактики вирусных гепатитов и СПИДа ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск, Россия;

Туркутюков В.Б., д.м.н., профессор, зав. кафедрой эпидемиологии и военной эпидемиологии ФГБОУ ВО Тихоокеанский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Владивосток, Россия;

Троценко О.Е., д.м.н., директор ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск, Россия;

Котова В.О., зав. лабораторией эпидемиологии и профилактики вирусных гепатитов и СПИДа ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск, Россия;

Балахонцева Л.А., руководитель Дальневосточного окружного Центра по профилактике и борьбе со СПИД, ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск, Россия;

Бутакова Л.В., научный сотрудник Дальневосточного регионального научно-методического Центра по изучению энтеровирусных инфекций, ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск, Россия;

Варнавская Л.В., начальник филиала больницы ФКУЗ МСЧ 27 ФСИН РФ, г. Хабаровск, Россия;

Фоменко В.В., врач лабораторной диагностики филиала ФКУЗ МСЧ 27 ФСИН РФ, г. Хабаровск, Россия;

Чечулина М.А., врач-инфекционист, ФКУЗ МСЧ 27 ФСИН РФ, г. Хабаровск, Россия;

Крапивкин А.И., главный врач ГБУЗ Чукотская окружная больница, г. Анадырь, Россия;

Зиньковская С.В., зав. кабинетом по профилактике и борьбе со СПИД и ИЗ, врач-инфекционист ГБУЗ Чукотская окружная больница, г. Анадырь, Россия;

Будай Г.И., врач клинической лабораторной диагностики лаборатории по диагностике ВИЧ и инфекционных заболеваний централизованной КДЛ ВЛ-ДП, ГБУЗ Чукотская окружная больница, г. Анадырь, Россия;

Янович О.А., главный врач ОГКУЗ Центр профилактики и борьбы со СПИД, г. Биробиджан, Россия;

Ломакина Е.А., главный врач ГБУЗ Сахалинский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД, г. Южно-Сахалинск, Россия;

Лукина З.И., главный врач ГБУЗ Магаданский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД, г. Магадан, Россия.

Authors:

Bazykina E.A., PhD Student, Epidemiology and Military Epidemiology Department, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation; Junior Researcher, Laboratory of Epidemiology and Prophylaxis of Viral Hepatitis and AIDS, Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russian Federation;

Turkutyukov V.B., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Epidemiology and Military Epidemiology Department, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation;

Trotsenko O.E., PhD, MD (Medicine), Director of the Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russian Federation;

Kotova V.O., Head of the Laboratory of Epidemiology and Prevention of Viral Hepatitis and AIDS of the Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russian Federation;

Balakhontseva L.A., Head of the Far Eastern Regional Center on Prevention and Combat Against AIDS of the Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russian Federation;

Butakova L.V., Researcher, Far Eastern Regional Research Guidance Center on Enterovirus Infections, Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russian Federation;

Varnavskaya L.V., Head of Hospital Primary Healthcare Unit 27 of the Russian Federation, Khabarovsk, Russian Federation;

Fomenko V.V., Clinical Pathologist, Branch of Hospital Primary Healthcare Unit 27 of the Russian Federation, Khabarovsk, Russian Federation;

Chechulina M.A., Infectious Disease Physician, Hospital Primary Healthcare Unit 27 of the Russian Federation, Khabarovsk, Russian Federation;

Krapivkin A.I., Head Physician, Chukotka Regional Hospital, Anadyr, Russian Federation;

Zinkovskaya S.V., Head of the Cabinet of Prevention and Combat Against AIDS and Infectious Diseases, Infectious Disease Physician, Chukotka Regional Hospital, Anadyr, Russian Federation;

Budai G.I., Clinical Laboratory Physician of the HIV and Infectious Diseases Diagnostic Laboratory of the Centralized Clinical Diagnostic Laboratory, Chukotka Regional Hospital, Anadyr, Russian Federation;

Yanovich O.A., Head Physician, Center on Prevention and Combat Against AIDS, Birobidzhan, Russian Federation;

Lomakina E.A., Head Physician, Sakhalin Regional Center on Prevention and Combat Against AIDS, Yuzhno-Sakhalinsk, Russian Federation;

Lukina Z.I., Head Physician, Magadan Region Center on Prevention and Combat Against AIDS, Magadan, Russian Federation.

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВНУТРИУТРОБНЫХ И ВНУТРИБОЛЬНИЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ НОВОРОЖДЕННЫХ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

М.В. Иванова, А.Я. Миндлина, Р.В. Полибин, А.В. Ушанова

ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Резюме. Внутрибольничные инфекции в акушерских стационарах характеризуются высоким уровнем заболеваемости, значительным ущербом, причиняемым здоровью новорожденных и большой социально-экономической значимостью. Цель исследования: выявить эпидемиологические особенности внутрибольничных и внутриутробных инфекций новорожденных в Российской Федерации. *Материалы и методы.* Выборка проводилась из формы федерального статистического наблюдения № 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» за 2008–2016 гг., Единой межведомственной информационно-статистической системы. Была проанализирована заболеваемость внутриутробными и внутрибольничными инфекциями новорожденных за период с 2008 по 2016 гг. по субъектам Российской Федерации. Субъекты были разделены на квартили по уровню заболеваемости внутриутробными и внутрибольничными инфекциями новорожденных с учетом доверительных границ. *Результаты.* В Российской Федерации рост заболеваемости внутриутробными инфекциями новорожденных отмечается в 30 субъектах, снижение — в 31 субъекте, отсутствие динамики — в 13 субъектах; в отношении заболеваемости внутрибольничных инфекций новорожденных рост наблюдается в 7 субъектах, снижение — в 41 субъекте, отсутствие динамики — в 26 субъектах; рост соотношения внутриутробных и внутрибольничных инфекций новорожденных отмечается в 40 субъектах, снижение — в 15 субъектах, отсутствие динамики — в 19 субъектах. По представленным выше закономерностям можно выделить 9 основных групп. Наиболее многочисленной (16 субъектов) является группа, в которой наблюдается рост заболеваемости внутриутробными инфекциями, снижение заболеваемости внутрибольничными инфекциями и увеличение соотношения внутриутробных и внутрибольничных инфекций новорожденных. В подавляющем большинстве субъектов Российской Федерации регистрация случаев внутрибольничных инфекций осуществляется не в полном объеме. Можно выделить всего лишь 7 субъектов с наиболее адекватной регистрацией внутрибольничных и внутриутробных инфекций новорожденных: Вологодская область, Забайкальский край, Нижегородская, Омская, Оренбургская, Пензенская, Свердловская области. *Заключение.* Для полноценной оценки ситуации по внутрибольничным и внутриутробным инфекциям новорожденных необходимо расследование каждого случая госпитальным эпидемиологом; стандартный подход к определению случая инфекции, связанной с оказанием медицинской помощи, и внутриутробных инфекций; официальная регистрация всех случаев, ответственность всех сотрудников учреждения за регистрацию случаев инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, регулярный анализ данных с помощью научно обоснованных инструментов.

Ключевые слова: внутриутробные инфекции, внутрибольничные инфекции, инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи, регистрация, заболеваемость, смертность.

Адрес для переписки:

Полибин Роман Владимирович
119435, Россия, Москва, ул. Б. Пироговская, 2, стр. 2,
ФГАОУ ВО ПМГМУ им. И.М. Сеченова.
Тел.: 8 (926) 349-52-43 (моб.).
E-mail: polibin@bk.ru

Contacts:

Roman V. Polibin
119435, Russian Federation, Moscow, Bolshaya Pirogovskaya str., 2/2,
I.M. Sechenov First Moscow State Medical University.
Phone: +7 (926) 349-52-43 (mobile).
E-mail: polibin@bk.ru

Библиографическое описание:

Иванова М.В., Миндлина А.Я., Полибин Р.В., Ушанова А.В.
Эпидемиологические особенности внутриутробных
и внутрибольничных инфекций новорожденных в Российской
Федерации // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 1. С. 193–202.
doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-193-202

Citation:

Ivanova M.V., Mindlina A.Ya., Polibin R.V., Ushanova A.V. Russia-
wide epidemiological survey of congenital and nosocomial infections
in newborns // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya
i immunitet, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 193–202. doi: 10.15789/2220-7619-2019-
1-193-202

RUSSIA-WIDE EPIDEMIOLOGICAL SURVEY OF CONGENITAL AND NOSOCOMIAL INFECTIONS IN NEWBORNS

Ivanova M.V., Mindlina A.Ya., Polibin R.V., Ushanova A.V.

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Abstract. High prevalence and great socio-economic impact of nosocomial infections is documented in obstetric hospitals. Objective: to uncover Russia-wide epidemiological features for congenital and nosocomial infections in newborns. Material and Methods: the data covering 2008–2016 period were retrieved from the Federal Statistical Monitoring Form No. 2 “Report on Infectious and Parasitic Diseases”, via the Unified Interdepartmental Information Statistical System. During 2008–2016, incidence of congenital and nosocomial infections in newborns was analyzed in various constituents of the Russian Federation, which were divided into quartile groups including confidence interval. Results: It was found that the increased/decreased/unchanged incidence of congenital infections in newborns was shown in 30, 31 and 13 subjects, respectively. In case of nosocomial infections in newborns, its incidence was increased/decreased/unchanged in 7, 41 and 26 subjects, respectively. Moreover, a congenital/nosocomial infection ratio in newborns was increased/decreased/unchanged in 40, 15 and 19 subjects, respectively. Based on the morbidity pattern, 9 major groups might be distinguished. In particular, the most abundant (16 subjects) was the group with increased incidence of congenital infections, decreased incidence of nosocomial infections and increased congenital/nosocomial infection ratio in newborns. However, it is worth mentioning that recording of nosocomial infection cases is incomplete in the vast majority of the subjects of the Russian Federation: as few as seven subjects may be highlighted providing a proper registration of nosocomial and congenital infections in newborns such as: Vologda Region, Trans-Baikal Territory, Nizhny Novgorod Region, Omsk Region, Orenburg Region, Penza Region, and Sverdlovsk Region. Conclusion: to fully assess an objective status on nosocomial and congenital infections in newborns, it is necessary that a hospital epidemiologist investigates every single case; ensure applying a standard approach to determine a case of healthcare-associated infection, congenital infections; official recording of all cases; responsibility of all staff members involved in recording healthcare-associated infection cases; regularly reviewed data by using science-based methods. Key words: congenital infections, nosocomial infections, healthcare associated infections, registration, incidence, mortality.

Key words: congenital infections, nosocomial infections, healthcare associated infections, registration, incidence, mortality.

Введение

Внутрибольничные инфекции (ВБИ) новорожденных характеризуются высоким уровнем заболеваемости, значительным ущербом, причиняемым здоровью новорожденных, и большой социально-экономической значимостью [2, 13].

Приводимые в отечественной и зарубежной литературе показатели ВБИ новорожденных часто не сопоставимы из-за отсутствия общих подходов к организации системы учета и регистрации заболеваний. В зарубежной литературе имеется мало данных относительно заболеваемости ВБИ в отделениях для здоровых новорожденных, где срок пребывания в стационаре ограничивается 2–3 сутками. Публикуемые показатели заболеваемости сравнительно низкие и составляют от 0,3 до 1,7 на 100 новорожденных [1, 15, 16].

Внедрение современных перинатальных технологий, позволяющих сохранять жизнь глубоко недоношенным и больным детям, повышает риск возникновения ВБИ [6]. Заболеваемость ВБИ в отделениях реанимации и интенсивной терапии новорожденных (ОРИТН) значительно выше — от 1,8 до 39,8 на 100 поступивших или выписанных [5, 12].

Новорожденные могут быть инфицированы внутриутробно, во время родов или после рождения от матери или от других источников в стационаре. Трудность определения заразился ли новорожденный от матери или в стационаре порождает определенную неточность в идентификации внутриутробных и внутрибольничных инфекций.

В последние годы наблюдается рост заболеваемости внутриутробными инфекциями (ВУИ) новорожденных, которые являются одной из ведущих причин мертворождаемости, неонатальной заболеваемости, инвалидности и летальности среди детей. Истинная частота ВУИ до настоящего времени не установлена, так как в Российской Федерации отсутствуют единые подходы к их диагностике, учету и регистрации (по данным различных исследований она варьирует от 2 до 58%; основная часть авторов указывает на частоту 10 на 100 новорожденных с тенденцией к росту) [3, 4, 7, 9, 14].

При проведении анализа заболеваемости новорожденных следует дифференцировать ВБИ от внутриутробной инфекционной патологии [10].

Заболевания новорожденных инфекциями, вызванными условно патогенной флорой и вы-

явленные в период пребывания в акушерском стационаре и/или в течение 7 дней после выписки, подлежат учету по данному стационару. Генерализованные формы (сепсис, остеомиелит, менингит) учитываются за стационаром в течение месяца после рождения.

Внутриутробными (трансплацентарными) считаются инфекции, проявившиеся, как правило, менее чем через 48 ч после рождения, если нет оснований считать, что заражение произошло после родов или при прохождении через родовые пути [11].

Многочисленное превышение числа случаев ВУИ над количеством случаев ВБИ новорожденных свидетельствует о возможном сокрытии случаев внутрибольничной инфекции у новорожденных под диагнозом «внутриутробная инфекция» [8].

В связи с этим, целью нашего исследования было выявление эпидемиологических особенностей внутрибольничных и внутриутробных инфекций новорожденных в Российской Федерации.

Материалы и методы

Выборка проводилась из формы федерального статистического наблюдения № 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» за 2008–2016 гг., Единой межведомственной информационно-статистической системы (ЕМИСС).

Была проанализирована заболеваемость ВУИ и ВБИ новорожденных за период с 2008 по 2016 гг. по субъектам Российской Федерации. Субъекты были разделены на квартили по уровню заболеваемости ВУИ и ВБИ новорожденных с учетом доверительных границ, рассчитанных на основании значений стандартного отклонения.

Результаты

За изучаемый период в Российской Федерации заболеваемость ВУИ выросла на 50,4% (с 11,5 на 1000 новорожденных в 2008 г. до 17,3 в 2016 г.), при этом наблюдается снижение заболеваемости ВБИ на 26% (с 2,74 на 1000 новорожденных в 2008 г. до 2,03 в 2016 г.) (рис. 1) и увеличение соотношения внутриутробных и внутрибольничных инфекций новорожденных [при этом соотношение увеличилось более чем в 2 раза (с 4,2:1 в 2008 г. до 8,5:1 в 2016 г.)] (рис. 2).

Следует отметить увеличение смертности новорожденных за последние годы, как от ВУИ на 30,4% (с 0,23 на 1000 новорожденных в 2008 г. до 0,3 в 2016 г.), так и от ВБИ более чем в 3 раза (с 0,008 на 1000 новорожденных в 2008 г. до 0,023 в 2016 г.). При этом смертность от ВУИ в 2016 г. в 12 раз превышала смертность от ВБИ (рис. 3).

За изучаемый период в Российской Федерации рост заболеваемости ВУИ новорожденных отмечается в 30 субъектах, снижение — в 31 субъекте, отсутствие динамики — в 13 субъектах; рост заболеваемости ВБИ новорожденных отмечается в 7 субъектах, снижение — в 41 субъекте, отсутствие динамики — в 26 субъектах; рост соотношения ВУИ и ВБИ новорожденных отмечается в 40 субъектах, снижение — в 15 субъектах, отсутствие динамики — в 19 субъектах.

Вместе с тем, ситуация в регионах по проявлениям заболеваемости ВУИ и ВБИ существенно различалась.

На основании проведенного анализа заболеваемости ВУИ и ВБИ, все субъекты были разделены на квартили.

В группах при анализе квартилей были выявлены территории с недостаточной регистрацией ВУИ [0 квартиль — низкий уровень заболеваемости ВУИ (0–2,1 на 1000 новорожденных)];



Рисунок 1. Заболеваемость ВБИ и ВУИ в Российской Федерации (на 1000 новорожденных) в 2008–2016 гг.

Figure 1. 2008–2016 Russia-wide incidence of nosocomial and congenital infections in newborns (per 1000 newborns)

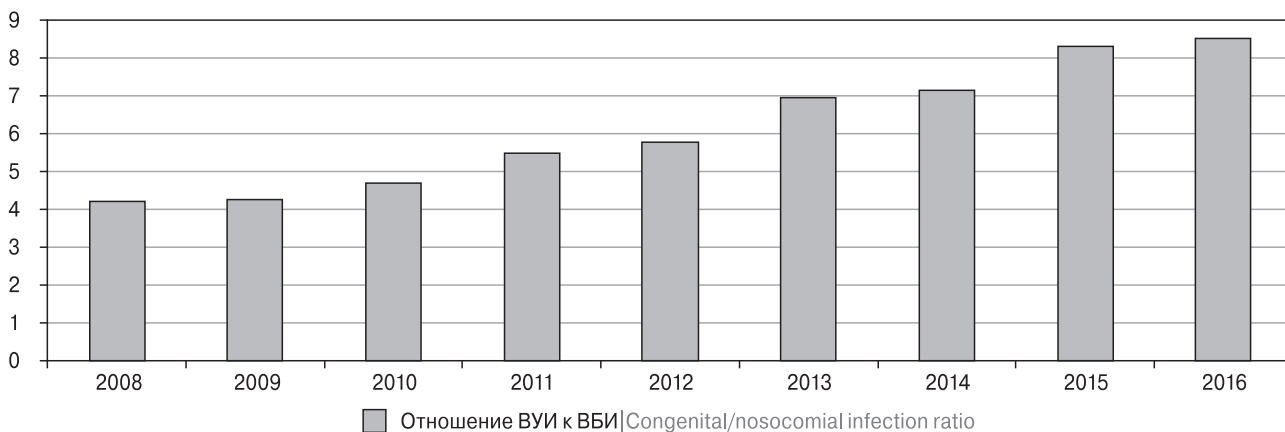


Рисунок 2. Отношение ВУИ к ВБИ в Российской Федерации в 2008–2016 гг.
 Figure 2. 2008–2016 Russia-wide congenital/nosocomial infection ratio in newborns

ВБИ новорожденных [0 квартиль — низкий уровень заболеваемости ВБИ новорожденных (0–0,7 на 1000 новорожденных)], и территории, на которых многократное преобладание заболеваемости ВУИ над ВБИ (> 10:1) свидетельствует о возможном сокрытии случаев ВБИ под диагнозом «Внутриутробная инфекция».

Можно выделить всего лишь 7 субъектов с наилучшей регистрацией ВБИ и ВУИ новорожденных [ВУИ (2–3 квартиль — высокий и средневысокий уровень заболеваемости ВУИ новорожденных (> 7,0 на 1000 новорожденных), ВБИ новорожденных (3–4 квартиль — наиболее высокий и высокий уровень заболеваемости ВБИ новорожденных (> 2,9 на 1000 новорожденных)] и соотношением ВУИ и ВБИ, не превышающим 4,3:1.

Территории, не удовлетворяющие данным условиям, принято считать субъектами со средним уровнем регистрации ВБИ и ВУИ новорожденных.

Можно разделить субъекты по тенденции заболеваемости ВУИ и ВБИ новорожденных и их соотношению на 9 групп.

1 группа: наблюдается рост заболеваемости ВУИ, снижение заболеваемости ВБИ и увеличение соотношения ВУИ и ВБИ новорожденных.

В эту группу входит 16 субъектов. При анализе квартилей были выявлены территории с наилучшей регистрацией ВБИ и ВУИ новорожденных: Вологодская, Оренбургская, Свердловская области.

Субъекты со средним уровнем регистрации ВБИ и ВУИ новорожденных: Санкт-Петербург, Курская, Ленинградская, Московская области, Пермский край.

Были выявлены территории с недостаточной (низкой) регистрацией ВУИ (Брянская область), ВБИ новорожденных (Красноярский край, Чувашская Республика), и территории, на кото-



Рисунок 3. Смертность от ВБИ и ВУИ в Российской Федерации (на 1000 новорожденных) в 2008–2016 гг.

Figure 3. 2008–2016 Russia-wide mortality rate for nosocomial and congenital infections in newborns

Таблица 1. Распределение субъектов Российской Федерации по квартилям в зависимости от регистрации случаев ВУИ, ВБИ и их соотношения (недостаточная регистрация)

Table 1. A quartile distribution of subjects of The Russian Federation based on incidence of congenital and nosocomial infection cases and congenital/nosocomial infection ratio in newborns (insufficient registration)

№ No.	Субъекты РФ Subjects of The Russian Federation	Заболеемость ВБИ Incidence of nosocomial infections	Заболеемость ВУИ Incidence of congenital infections	ВУИ/ВБИ Congenital/nosocomial infection ratio
1	Алтайский край Republic of Altai	0	2	18,9
2	Амурская область Amur Region	1	3	29,5
3	Астраханская область Astrakhan Region	0	2	48,4
4	Брянская область Bryansk Region	1	0	1,3
5	Владимирская область Vladimir Region	0	3	28,5
6	Волгоградская область Volgograd Region	0	1	31,3
7	Воронежская область Voronezh Region	2	0	0,8
8	Москва Moscow	2	3	37,9
9	г. Севастополь Sevastopol	0	1	0
10	Еврейская автономная область Jewish Autonomous Region	1	0	2,7
11	Кабардино-Балкарская Республика Kabardino-Balkarian Republic	3	0	0,2
12	Калининградская область Kaliningrad Region	1	1	12,1
13	Калужская область Kaluga Region	0	2	9,8
14	Карачаево-Черкесская Республика Karachayev-Circassian Republic	0	0	4,4
15	Кемеровская область Kemerovo Region	2	3	11,0
16	Кировская область Kirov Region	1	2	11,5
17	Краснодарский край Krasnodar Territory	1	3	146,8
18	Красноярский край Krasnoyarsk Territory	0	2	38,3
19	Курганская область Kurgan Region	2	0	1,1
20	Магаданская область Magadan Region	1	0	2,3
21	Новосибирская область Novosibirsk Region	1	3	25,8
22	Приморский край Primorye Territory	2	3	11,1
23	Псковская область Pskov Region	3	3	12,0
24	Республика Адыгея Republic of Adygeya	1	0	1,3
25	Республика Башкортостан Republic of Bashkortostan	1	0	1,3
26	Республика Бурятия Republic of Buryatia	1	0	3,2
27	Республика Дагестан Republic of Daghestan	1	0	1,7
28	Республика Ингушетия Republic of Ingushetia	1	0	0,1
29	Республика Крым Republic of Crimea	1	0	0,5
30	Республика Марий Эл Republic of Mari El	0	1	9,8
31	Республика Мордовия Republic of Mordovia	2	3	21,0
32	Республика Саха (Якутия) Republic of Sakha (Yakutia)	2	0	0,3
33	Республика Северная Осетия — Алания Republic of North Ossetia — Alania	2	0	0,8
34	Республика Татарстан (Татарстан) Republic of Tatarstan	2	3	10,9
35	Республика Тыва Republic of Tuva	1	0	0,3
36	Республика Хакасия Republic of Khakassia	1	2	10,6
37	Ростовская область Rostov Region	0	1	12,2
38	Рязанская область Ryazan Region	3	3	11,8

Окончание таблицы 1. Распределение субъектов Российской Федерации по квартилям в зависимости от регистрации случаев ВУИ, ВБИ и их соотношения (недостаточная регистрация)

Table 1. A quartile distribution of subjects of The Russian Federation based on incidence of congenital and nosocomial infection cases and congenital/nosocomial infection ratio in newborns (insufficient registration) (continued)

№ No.	Субъекты РФ Subjects of The Russian Federation	Заболеемость ВБИ Incidence of nosocomial infections	Заболеемость ВУИ Incidence of congenital infections	ВУИ/ВБИ Congenital/nosocomial infection ratio
39	Самарская область Samara Region	0	2	12,3
40	Саратовская область Saratov Region	1	3	17,4
41	Сахалинская область Sakhalin Region	3	3	10,0
42	Смоленская область Smolensk Region	2	3	30,6
43	Ставропольский край Stavropol Territory	1	2	22,9
44	Тамбовская область Tambov Region	1	3	33,6
45	Тверская область Tver Region	1	2	14,0
46	Томская область Tomsk Region	2	0	1,1

№ No.	Субъекты РФ Subjects of The Russian Federation	Заболеемость ВБИ Incidence of nosocomial infections	Заболеемость ВУИ Incidence of congenital infections	ВУИ/ВБИ Congenital/nosocomial infection ratio
47	Тюменская область Tyumen Region	1	0	2,7
48	Ульяновская область Ulyanovsk Region	1	2	11,7
49	Ханты-Мансийский автономный округ Khanty-Mansi Autonomous Area — Yugra	1	2	19,7
50	Чеченская Республика Chechen Republic	0	0	0
51	Чувашская Республика — Чувашия Chuvash Republic	0	2	60,1
52	Чукотский автономный округ Chukotka Autonomous Area	0	0	0

рых многократное преобладание заболеваемости ВУИ над ВБИ свидетельствует о возможном сокрытии случаев ВБИ (Амурская область, Москва, Красноярский край, Смоленская область, Ставропольский край, Ханты-Мансийский автономный округ, Чувашская Республика).

Наиболее демонстративно отражает закономерности распространения ВУИ и ВБИ новорожденных в 1 группе ситуация в Москве.

За изучаемый период в Москве заболеваемость ВУИ выросла на 223,9% (с 26,4 на 1000 новорожденных в 2008 г. до 85,5 в 2016 г.), при этом наблюдается снижение заболеваемости ВБИ на 61,8% (с 1,99 на 1000 новорожденных в 2008 г. до 0,76 в 2016 г.) и увеличение соотношения ВУИ и ВБИ новорожденных более чем в 8 раз (с 13,3:1 в 2008 г. до 112:1 в 2016 г.). Отмечается увеличение смертности новорожденных за последние годы, как от ВУИ на 54,8% (с 0,31 на 1000 новорожденных в 2008 г. до 0,48 в 2016 г.), так и от ВБИ. При этом смертность от ВУИ в 2015 г. в 21 раз превышала смертность от ВБИ.

2 группа: снижается заболеваемость ВУИ, отсутствует динамика заболеваемости ВБИ и снижается соотношение ВУИ и ВБИ новорожденных (10 субъектов).

Субъекты со средним уровнем регистрации ВБИ и ВУИ новорожденных: Белгородская, Липецкая, Новгородская области, республики Калмыкия и Коми, Ярославская область.

Во 2 группе были выявлены территории с недостаточной (низкой) регистрацией ВУИ (Томская область), ВБИ новорожденных (Владимирская область), и территории, на которых многократное преобладание заболеваемости ВУИ над ВБИ свидетельствует о возможном сокрытии случаев ВБИ (Владимирская, Псковская и Рязанская области).

Наиболее показательно отражает закономерности распространения ВУИ и ВБИ новорожденных в 2 группе ситуация во Владимирской области.

За изучаемый период во Владимирской области отмечается снижение заболеваемости ВУИ на 62,1% (с 24,3 на 1000 новорожденных в 2008 г. до 9,2 в 2016 г.), отсутствие динамики заболеваемости ВБИ и снижение соотношения ВУИ и ВБИ новорожденных в 1,3 раза (с 38:1 в 2008 г. до 29:1 в 2016 г.). Регистрируется увеличение смертности новорожденных от ВУИ за последние годы на 13,3% (с 0,45 на 1000 новорожденных в 2008 г. до 0,51 в 2016 г.) при нулевом уровне смертности от ВБИ.

3 группа: невозможно выявить тенденцию в связи с недостаточной регистрацией случаев заболевания ВУИ и ВБИ новорожденных (11 субъектов).

Субъекты со средним уровнем регистрации ВБИ и ВУИ новорожденных: Ивановская область, Ненецкий автономный округ.

В 3 группе при анализе квартилей были выявлены территории с недостаточной (низкой) регистрацией ВУИ (Карачаево-Черкесская Республика, Магаданская область, республики Адыгея, Дагестан, Ингушетия, Чеченская Республика, Чукотский автономный округ, Республика Крым), ВБИ новорожденных (Карачаево-Черкесская и Чеченская республики, Чукотский автономный округ, г. Севастополь и Республика Крым).

Наиболее демонстративно отражает закономерности распространения ВУИ и ВБИ новорожденных в 3 группе ситуация в Чукотском автономном округе.

За изучаемый период в Чукотском автономном округе заболеваемость ВУИ новорожденных регистрировалась только в 2009 и 2010 гг., что свидетельствует о недостаточной регистрации случаев. Следует отметить нулевой уровень смертности новорожденных за последние годы, как от ВУИ, так и от ВБИ.

4 группа: наблюдается снижение заболеваемости ВУИ, снижение заболеваемости ВБИ и отсутствие динамики соотношения ВУИ и ВБИ новорожденных.

В эту группу входит 8 субъектов. При анализе квартилей были выявлены субъекты со средним уровнем регистрации ВБИ и ВУИ новорожденных: Хабаровский край.

В 4 группе были выявлены территории с недостаточной (низкой) регистрацией ВУИ (Республика Бурятия, Республика Тыва, Тюменская область), ВБИ новорожденных (Алтайский край, Калужская область, Республика Марий Эл, Ростовская область), и территории, на которых многократное преобладание заболеваемости ВУИ над ВБИ свидетельствует о возможном сокрытии случаев ВБИ (Алтайский край, Ростовская область).

Наиболее показательно отражает закономерности распространения ВУИ и ВБИ новорожденных в 4 группе ситуация в Хабаровском крае.

За изучаемый период в Хабаровском крае отмечается снижение заболеваемости ВУИ на 45,3% (с 7,5 на 1000 новорожденных в 2008 г. до 4,1 в 2016 г.), снижение заболеваемости ВБИ на 69% (с 2,9 на 1000 новорожденных в 2008 г. до 0,9 в 2016 г.) и отсутствие динамики соотношения ВУИ и ВБИ новорожденных. Регистрируется нулевой уровень смертности новорожденных за последние годы, как от ВУИ, так и от ВБИ.

5 группа: растет заболеваемость ВУИ, отсутствует динамика заболеваемости ВБИ и растет соотношение ВУИ и ВБИ новорожденных (в 8-ми субъектах).

В 5 группе при анализе квартилей были выявлены территории с наилучшей регистрацией ВУИ и ВБИ новорожденных: Нижегородская область.

Субъекты со средним уровнем регистрации ВБИ и ВУИ новорожденных: Орловская область, Ямало-Ненецкий автономный округ.

В 5 группе были выявлены территории с недостаточной (низкой) регистрацией ВУИ (Кабардино-Балкарская Республика, Республика Башкортостан), ВБИ новорожденных (Самарская область), и территории, на которых многократное преобладание заболеваемости ВУИ над ВБИ свидетельствует о возможном сокрытии случаев ВБИ (Республика Хакасия, Самарская область, Тверская область).

Наиболее демонстративно отражает закономерности распространения ВУИ и ВБИ новорожденных в 5 группе ситуация в Нижегородской области.

За изучаемый период в Нижегородской области заболеваемость ВУИ выросла на 87,3% (с 7,1 на 1000 новорожденных в 2008 г. до 13,3 в 2016 г.), при этом наблюдается отсутствие динамики заболеваемости ВБИ и увеличение соотношения ВУИ и ВБИ новорожденных в 1,7 раза (с 1,1:1 в 2008 г. до 1,9:1 в 2016 г.).

При этом смертность от ВУИ в 2015 г. в 7 раз превышала смертность от ВБИ.

6 группа: наблюдается снижение заболеваемости ВУИ, снижение заболеваемости ВБИ и рост соотношения ВУИ и ВБИ новорожденных (7 субъектов).

Субъекты со средним уровнем регистрации ВБИ и ВУИ новорожденных: Мурманская и Новосибирская области, Республика Карелия.

В 6 группе были выявлены территории с недостаточной (низкой) регистрацией ВУИ (Еврейская автономная область), и территории, на которых многократное преобладание заболеваемости ВУИ над ВБИ свидетельствует о возможном сокрытии случаев ВБИ (Кемеровская, Кировская, Новосибирская и Тамбовская области).

Наиболее показательно отражает закономерности распространения ВУИ и ВБИ новорожденных в 6 группе ситуация в Мурманской области.

За изучаемый период в Мурманской области отмечается снижение заболеваемости ВУИ на 62% (с 7,1 на 1000 новорожденных в 2008 г. до 2,7 в 2016 г.), снижение заболеваемости ВБИ на 78,8% (с 1,65 на 1000 новорожденных в 2008 г. до 0,35 в 2016 г.) и рост соотношения ВУИ и ВБИ новорожденных в 1,8 раз (с 4,3:1 в 2008 г. до 7,7:1 в 2016 г.). Регистрируется снижение смертно-

сти новорожденных от ВУИ за последние годы в 2,8 раза (с 1,65 на 1000 новорожденных в 2008 г. до 0,58 в 2016 г.), при нулевом уровне смертности от ВБИ.

7 группа: наблюдается отсутствие динамики заболеваемости ВУИ, снижение заболеваемости ВБИ и рост соотношения ВУИ и ВБИ новорожденных.

В эту группу входит 6 субъектов. При анализе квартилей были выявлены территории с наилучшей регистрацией ВБИ и ВУИ новорожденных: Пензенская область.

Субъекты со средним уровнем регистрации ВБИ и ВУИ новорожденных: Архангельская область.

В 7 группе были выявлены территории с недостаточной (низкой) регистрацией ВБИ новорожденных (Волгоградская область), и территории, на которых многократное преоблада-

ние заболеваемости ВУИ над ВБИ свидетельствует о возможном сокрытии случаев ВБИ (Волгоградская и Калининградская области, Республика Татарстан, Саратовская область).

Наиболее демонстративно отражает закономерности распространения ВУИ и ВБИ новорожденных в 7 группе ситуация в Саратовской области.

За изучаемый период в Саратовской области наблюдается отсутствие динамики заболеваемости ВУИ, снижение заболеваемости ВБИ на 30% (с 1,0 на 1000 новорожденных в 2008 г. до 0,7 в 2016 г.) и рост соотношения ВУИ и ВБИ новорожденных более чем в 1,4 раза (с 16,5:1 в 2008 г. до 23,4:1 в 2016 г.). Следует отметить увеличение смертности новорожденных от ВУИ за последние годы в 3 раза (с 0,1 на 1000 новорожденных в 2008 г. до 0,3 в 2016 г.), при практически нулевом уровне смертности от ВБИ.

8 группа: отсутствует динамика заболеваемости ВУИ, ВБИ, соотношения ВУИ и ВБИ новорожденных (6 субъектов).

Были выявлены территории с наилучшей регистрацией ВБИ и ВУИ новорожденных: Забайкальский край.

Субъекты со средним уровнем регистрации ВБИ и ВУИ новорожденных: Иркутская область.

В 8 группе были выявлены территории с недостаточной (низкой) регистрацией ВУИ (Курганская область, Республика Северная Осетия), ВБИ новорожденных (Астраханская область), и территории, на которых многократное преобладание заболеваемости ВУИ над ВБИ свидетельствует о возможном сокрытии случаев ВБИ (Астраханская область, Приморский край).

Наиболее показательно отражает закономерности распространения ВУИ и ВБИ новорожденных в 8 группе ситуация в Забайкальском крае.

За изучаемый период в Забайкальском крае заболеваемость ВУИ, ВБИ и соотношение ВУИ и ВБИ новорожденных остаются неизменными. Регистрируется нулевой уровень смертности новорожденных за последние годы, как от ВУИ, так и от ВБИ.

9 группа: наблюдаются другие тенденции заболеваемости ВУИ, ВБИ и соотношения ВУИ и ВБИ новорожденных (13 субъектов).

При анализе квартилей были выявлены территории с наилучшей регистрацией ВБИ и ВУИ новорожденных: Омская область.

Субъекты со средним уровнем регистрации ВБИ и ВУИ новорожденных: Костромская область, Камчатский край, Республика Алтай, Тульская область, Удмуртская Республика, Челябинская область.

В 9 группе были выявлены территории с недостаточной (низкой) регистрацией ВУИ

Таблица 2. Распределение субъектов Российской Федерации по квартилям в зависимости от регистрации случаев ВУИ, ВБИ и их соотношения (наиболее адекватная регистрация)

Table 2. A quartile distribution of subjects of The Russian Federation based on incidence of congenital and nosocomial infection cases and congenital/nosocomial infection ratio in newborns (most adequate registration)

№ No.	Субъекты РФ Subjects of The Russian Federation	Заболеваемость ВБИ Incidence of nosocomial infections	Заболеваемость ВУИ Incidence of congenital infections	ВУИ/ВБИ Congenital/nosocomial infection ratio
1	Вологодская область Vologda Region	3	2	1,3
2	Забайкальский край Trans-Baikal Territory	3	3	2,6
3	Нижегородская область Nizhny Novgorod Region	3	2	1,4
4	Омская область Omsk Region	4	2	0,7
5	Оренбургская область Orenburg Region	3	2	2,2
6	Пензенская область Penza Region	3	2	3,4
7	Свердловская область Sverdlovsk Region	3	2	1,1

(Воронежская область, Республика Саха), и территории, на которых многократное преобладание заболеваемости ВУИ над ВБИ свидетельствует о возможном сокрытии случаев ВБИ (Сахалинская и Ульяновская области, Краснодарский край, Республика Мордовия).

Наиболее полно регистрируют заболеваемость ВУИ и ВБИ новорожденных в 9 группе в Омской области.

За изучаемый период в Омской области наблюдается снижение заболеваемости ВУИ на 77,1% (с 24,9 на 1000 новорожденных в 2008 г. до 5,7 в 2016 г.), снижение заболеваемости ВБИ на 37,6% (с 14,1 на 1000 новорожденных в 2008 г. до 8,8 в 2016 г.), снижение соотношения ВУИ и ВБИ новорожденных в 3,7 раза (с 1,8:1 в 2008 г. до 0,7:1 в 2016 г.). Регистрируется уменьшение смертности от ВУИ новорожденных за исследуемый период в 6,2 раза (с 3,1 на 1000 новорожденных в 2008 г. до 0,5 в 2016 г.).

Обсуждение

Таким образом, в подавляющем большинстве субъектов Российской Федерации регистрация случаев ВБИ осуществляется не в полном объеме. Можно выделить всего лишь семь субъектов с наилучшей регистрацией ВБИ и ВУИ новорожденных: Вологодская область, Забайкальский край, Нижегородская, Омская, Оренбургская, Пензенская и Свердловская области.

Для полноценной оценки ситуации по ВБИ и ВУИ новорожденных необходимо расследование каждого случая ВУИ, ВБИ новорожденных госпитальным эпидемиологом; стандартный подход к определению случая ИСМП и ВУИ; официальная регистрация всех случаев ИСМП; ответственность всех сотрудников учреждения за регистрацию случаев ИСМП, регулярный анализ данных с помощью научно обоснованных инструментов.

Список литературы/References

1. Брико Н.И., Вартапетова Н.В., Карпушкина А.В., Брюшина Е.Б., Деметьева Л.А. Профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в акушерских отделениях стационарах: руководство. 1-е изд. М.: Институт здоровья семьи, 2012. 148 с. [Briko N.I., Vartapetova N.V., Karpushkina A.V., Brusina E.B., Dement'eva L.A. Prevention of healthcare associated infections in obstetric departments/hospitals: guidance. Moscow: Institute of Family Health, 2012. 148 p. (In Russ.)]
2. Брико Н.И., Фельдблюм И.В., Зуева Л.П., Брусина Е.Б., Захарова Ю.А., Любимова А.В., Ковалишена О.В., Стасенко В.Л. Организация и проведение эпидемиологического наблюдения и микробиологического мониторинга в учреждениях родовспоможения: Федеральные клинические рекомендации. М., 2015. 83 с. [Briko N.I., Fel'dbljum I.V., Zueva L.P., Brusina E.B., Zaharova Ju.A., Ljubimova A.V., Kovalishena O.V., Stasenko V.L. Organization and conduct of epidemiological surveillance and microbiological monitoring in maternity hospitals: Federal clinical recommendations. Moscow: 2015. 83 p. (In Russ.)]
3. Долгих Т.И., Баринов С.В., Проданчук Е.Г., Шелев М.В., Минакова Е.Ю. Инфекционная перинатальная патология: разработка стратегии диагностики и клинико-лабораторного мониторинга // Медицинский алфавит. Современная лаборатория. 2011. № 1. С. 16–20. [Dolghih T.I., Barinov S.V., Prodanchuk E.G., Shelev M.V., Minakova E.Yu. Infectious perinatal pathology: development of a strategy for diagnosis and clinical-laboratory monitoring. *Meditsinskiy alfavit. Sovremennaya laboratoriya = Modern Laboratory. Medical Alphabet*, 2011, no 1, pp. 16–20. (In Russ.)]
4. Заплатников А.Л., Коровина Н.А., Корнева М.Ю., Чебуркин А.В. Внутритрубные инфекции: диагностика, лечение, профилактика // Медицина неотложных состояний. 2013. № 1 (48). С. 25–33. [Zaplatnikov A.L., Korovina N.A., Korneva M.Ju., Cheburkin A.V. Congenital infections: diagnostics, treatment, prevention. *Meditsina neotlozhnykh sostoyaniy = Emergency Medicine*, 2013, no. 1 (48), pp. 25–33. (In Russ.)]
5. Зуева Л.П. Госпитальная эпидемиология // М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. С. 239–240. [Zueva L.P. Hospital epidemiology. Moscow: GEOTAR-Media, 2015, pp. 239–240. (In Russ.)]
6. Любимова А.В., Зуева Л.П., Пулин А.М., Александрович Ю.С. Основные компоненты инфекционного контроля в отделении реанимации и интенсивной терапии новорожденных // Эфферентная терапия. 2010. № 3. С. 91–97. [Ljubimova A.V., Zueva L.P., Pulin A.M., Aleksandrovich Ju.S. Essential components of infection control in neonatal intensive care units. *Efferentnaya terapiya = Efferent Therapy*, 2010, no. 3, pp. 91–97. (In Russ.)]
7. Инфекции в акушерстве и гинекологии. Под ред. О.В. Макарова, В.А. Алешкина, Т.Н. Савченко. 2-е изд. // М.: МЕДпресс-информ, 2009. 464 с. [Makarov O.V., Aleshkina V.A., Savchenko T.N. Infections in obstetrics and gynecology. Eds. O.V. Makarov, V.A. Aleshkina, T.N. Savchenko. 2nd ed. Moscow: MEDpress-inform, 2009. 464 p. (In Russ.)]
8. 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. 129 с. [On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2016: State report. Moscow: Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 2017. 129 p. (In Russ.)]
9. Послова Л.Ю. Клинико-эпидемиологическая и этиологическая характеристика внутриутробных инфекций // Медицинский альманах. 2016. № 3 (43). С. 27–31. [Poslova L.Yu. The clinical, epidemiological and etiological characteristics of prenatal infections. *Meditsinskiy al'manakh = Medical Almanac*, 2016, no. 3 (43), pp. 27–31. doi: 10.21145/2499-9954-2016-3-26-31 (In Russ.)]
10. Приказ Минздрава РФ от 26.11.1997 № 345 (ред. от 05.05.2000) «О совершенствовании мероприятий по профилактике внутрибольничных инфекций в акушерских стационарах» (вместе с «Инструкцией по организации и проведению профилактических и противоэпидемических мероприятий в акушерских стационарах», «Инструкцией по орга-

- низации и проведению эпидемиологического надзора за внутрибольничными инфекциями в акушерских стационарах. [Order of the Ministry of Health of the Russian Federation of 26.11.1997, No. 345 (ed. 05.05.2000) "On the improvement of measures for the prevention of nosocomial infections in obstetric hospitals" (with Instruction on the organization and conduct of epidemiological surveillance of nosocomial infections in obstetric hospitals Annex 2 to the order of the Ministry of Health of the Russian Federation of November 26, 1997, No. 345 "On the improvement of measures for the prevention of nosocomial infections in obstetric hospitals". URL: <http://www.consultant.ru/cons/cgi/online.cgi?req=doc&base=EXP&n=356423#029958288181202875> (09.04.2018) (In Russ.).
11. Санитарные правила и нормы (СанПиН) 2.1.3.2630-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность». зарегистрированы в Минюсте России 09.08.2010 № 18094, утверждены Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 18.05.2010 № 58. [Sanitary rules and norms (SanPiN) 2.1.3.2630-10 "Sanitary and epidemiological requirements for organizations engaged in medical activities", registered in the Ministry of Justice of Russia on 09.08.2010, No. 18094, approved by the Resolution of the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation, No. 58, dated May 18, 2010. (In Russ.)]
 12. Чубенко Г.И., Слепакова С.А., Шепотайлова Н.В. Микробиологический мониторинг возбудителей внутрибольничных инфекций в отделении реанимации и интенсивной терапии новорожденных // Инфекция и иммунитет. 2012. Т. 2, № 1–2. С. 499–500. [Chubenko G.I., Slepakova S.A., Shepotajlova N.V. Microbiological monitoring of pathogens of nosocomial infections in the department of resuscitation and intensive care of newborns. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2012, vol. 2, no 1–2, pp. 499–500. (In Russ.)]
 13. Bhalla A., Gries D.M. Acquisition of nosocomial pathogens on hands after contact with environmental surfaces near hospitalized patients. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, 2004, no. 25 (2), pp. 164–167. doi: 10.1086/502369
 14. Hassan J., Connell J. Translational mini-review series on infectious disease: congenital cytomegalovirus infection: 50 years on. *Clin. Exp. Immunol.*, 2007, vol. 149 (2), pp. 205–210. doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03454.x
 15. Makhoul I.R., Sujov P., Smolkin T. Epidemiological, clinical and microbiological characteristics of late-onset sepsis among very low birth weight infants in Israel: a national survey. *Pediatrics*, 2002, no. 109, pp. 34–39.
 16. Nagata E., Brito A., Matsuo T. Nosocomial infections in a neonatal intensive care unit: incidence and risk factors. *Am. J. Infect. Control.*, 2002, no. 30, pp. 26–31.

Авторы:

Иванова М.В., аспирант кафедры эпидемиологии и доказательной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

Миндлина А.Я., д.м.н., доцент, профессор кафедры эпидемиологии и доказательной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

Полибин Р.В., к.м.н., доцент, доцент кафедры эпидемиологии и доказательной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

Ушанова А.В., студент медико-профилактического факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия.

Authors:

Ivanova M.V., PhD Student, Department of Epidemiology and Evidence-Based Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation;

Mindlina A.Ya., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Department of Epidemiology and Evidence-Based Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation;

Polibin R.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Epidemiology and Evidence-Based Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation;

Ushanova A.V., Student, Faculty of Preventive Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation.

КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ *E. COLI* — ПРОДУЦЕНТОВ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИГЕНОВ *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI*

Ю.А. Кузютина, И.Б. Захарова, Д.В. Викторов

ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия

Резюме. Возможность завоза в Российскую Федерацию экзотических инфекций, в том числе и мелиоидоза, лабораторно подтвержденные случаи которого регулярно регистрируются в неэндемичных регионах мира, обуславливает необходимость разработки и совершенствования методов их ускоренной диагностики. Наличие перекрестной реактивности между филогенетически близкими видами рода *Burkholderia* затрудняет диагностику мелиоидоза методами экспресс-анализа, предусматривающими применение препаратов на основе моноклональных антител к эпитопам экзополисахарида возбудителя. Исследования, направленные на поиск антигенов-мишеней для создания группо- и видоспецифических иммунодиагностических препаратов нового поколения, позволяющих выявлять *Burkholderia pseudomallei*, не теряют актуальности. Цель работы заключалась в клонировании полных кодирующих последовательностей дифференцирующих поверхностных биополимеров *Burkholderia pseudomallei* с последующей оптимизацией схемы очистки рекомбинантных антигенов. В результате сравнительного *in silico* исследования в качестве целевых биомолекул были выбраны обладающие высокой иммуногенностью протеины внешней мембраны *B. pseudomallei* Omp38 и OmpA/MotB. В ПЦР были получены необходимые для клонирования специфические ампликоны генов *omp38* и *ompA/motB*, которые лигировали с линейным экспрессирующим вектором RIC-Ready pPAL7. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* C-Max5α для накопления рекомбинантных плазмидных молекул, после чего их выделяли и вводили в *E. coli* BL21(DE3) для высокоэффективной экспрессии рекомбинантных протеинов. По-видимому, из-за мультимерной организации белков стандартная процедура их очистки из нативного клеточного дезинтеграта оказалась неэффективной. Модификация методики очистки привела к повышению концентрации рекомбинантного белка в элюате. Однако ввиду привнесенных денатурирующих условий на промежуточных этапах очистки произошел гидролиз пептидных связей в молекулах целевых протеинов. Предполагаемым местом разрыва являлась ковалентная связь между аминокислотами пролин и аспарагин. В элюатах содержались N-концевые фрагменты, посредством которых рекомбинантные белки были связаны с неподвижной фазой хроматографической колонки. Аминокислотные последовательности N-концевых участков, соответствующих молекулярным массам элюированных пептидов, были оценены на предмет содержания линейных эпитопов. По результатам *in silico* анализа на исследуемых полипептидах было установлено присутствие ряда участков, обладающих выраженной антигенной активностью. Сконструированные штаммы *E. coli* BL21(DE3) VpsOmp39 и *E. coli* BL21(DE3) VpsOmpA являются продуцентами поверхностных протеинов Omp38 и OmpA/MotB возбудителя мелиоидоза, очищенные формы которых могут быть использованы в качестве основы разрабатываемых диагностических тест-систем.

Ключевые слова: мелиоидоз, *Burkholderia pseudomallei*, OmpA, Omp38, штамм-продуцент, рекомбинантный антиген, эпитоп.

Адрес для переписки:

Кузютина Юлия Александровна
400131, Россия, г. Волгоград, ул. Голубинская, 7,
ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский
противочумный институт.
Тел.: 8 (8442) 37-37-74. Факс: 8 (8442) 39-33-36.
E-mail: 6uoxumuk@mail.ru

Contacts:

Yulia A. Kuziyutina
400131, Russian Federation, Volgograd, Golubinskaya str., 7,
Volgograd Plague Control Research Institute.
Phone: +7 (8442) 37-37-74. Fax: +7 (8442) 39-33-36.
E-mail: 6uoxumuk@mail.ru

Библиографическое описание:

Кузютина Ю.А., Захарова И.Б., Викторов Д.В. Конструирование рекомбинантных штаммов *E. coli* — продуцентов специфических антигенов *Burkholderia pseudomallei* // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 1. С. 203–208. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-203-208

Citation:

Kuziyutina Yu.A., Zakharova I.B., Viktorov D.V. Engineering *E. coli* recombinant strains for high yield production of *Burkholderia pseudomallei* specific antigens // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 203–208. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-203-208

ENGINEERING *E. COLI* RECOMBINANT STRAINS FOR HIGH YIELD PRODUCTION OF BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI SPECIFIC ANTIGENS

Kuzyutina Yu.A., Zakharova I.B., Viktorov D.V.

Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation

Abstract. A risk of introducing into the Russian Federation exotic infections including laboratory-confirmed melioidosis regularly recorded worldwide necessitates development and improvement of express diagnostics tools. Cross reactivity between phylogenetically related species of the genus *Burkholderia* complicates melioidosis diagnostics by express test methods based on using monoclonal antibodies against pathogen exopolysaccharide epitopes. Searching for target antigens to create the next generation group- and species-specific immunodiagnostic reagents for identifying *Burkholderia pseudomallei* is still of high priority. The study was aimed at cloning complete coding sequences for cell surface proteins differentiating *Burkholderia pseudomallei* and optimizing recombinant antigens purification protocol. *In silico* comparative study allowed to select highly immunogenic *B. pseudomallei* outer membrane proteins Omp38 and OmpA/MotB as target biomolecules. For cloning, *omp38* and *ompA/motB* gene-specific amplicons were obtained by PCR and ligated with the linear expression vector RIC-Ready pPAL7. Competent *E. coli* C-Max5α cells were transformed by a ligation mixture for producing recombinant plasmids, which were further purified to transform *E. coli* BL21 (DE3) cells for robust recombinant protein expression. Due to a potential multimeric protein structure, a standard protein purification protocol from native cell lysate was inefficient, which was modified to increase recombinant protein yield. However, by adding denaturing conditions at intermediate purification steps caused hydrolysis of peptide bonds in the target proteins, presumably between proline and asparagine residues. As a result, N-terminal fragments connecting recombinant proteins to the stationary phase of chromatographic column were eluted and evaluated for linear epitope detection according to their molecular weights. *In silico* analysis data identified highly antigenic motifs within the polypeptides studied. Thus, strains of *E. coli* BL21(DE3) BpsOmp39 and *E. coli* BL21(DE3) BpsOmpA engineered by us produce cell surface proteins Omp38 and OmpA/MotB derived from melioidosis pathogen, which can be useful for developing diagnostic test systems.

Key words: melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*, OmpA, Omp38, producing strain, recombinant antigen, epitope.

Введение

Burkholderia pseudomallei является возбудителем особо опасного инфекционного заболевания мелиоидоза, который признан одной из основных причин острого летального сепсиса в ряде эндемичных регионов мира. Мелиоидоз распространен в странах Юго-Восточной Азии (Таиланд, Малайзия, Камбоджа, Вьетнам, Лаос, Бирма, Гонконг, Тайвань, Сингапур), на территориях южного Китая, Индостана, Северной Австралии, Папуа — Новой Гвинеи, Западной и Центральной Африки, а также о. Мадагаскар, в западном полушарии — Пуэрто-Рико, Сальвадора, островов Карибского бассейна, стран Латинской Америки (Венесуэла, Бразилия, Эквадор), где возбудитель входит в состав микробиоты почвы и воды стоячих водоемов. Вместе с тем регулярно регистрируются лабораторно подтвержденные завозные случаи мелиоидоза на неэндемичных по данному заболеванию регионах Северной Америки и Европы [7, 8]. Возрастающие масштабы туристической и трудовой миграции населения из Юго-Восточной Азии должны вызывать настороженность в отношении завоза мелиоидоза в Россию. Кроме того, *B. pseudomallei* рассматривается как потенциальное средство осуществления биотеррористических актов [3, 14], что подчеркивает необходимость разработки и совершенствования методов его ускоренной детекции и идентификации.

Согласно МУ 4.2.2787-10 в общей схеме лабораторной диагностики мелиоидоза иммунологическим методам отводится важная роль, особенно при экспресс-анализе поступивших на исследование проб. Для иммунофлуоресцентного и иммуноферментного анализов, а также реакции непрямой агглютинации бактерий применяют современные диагностические препараты и тест-системы, сконструированные с использованием моноклональных антител (МКА) различной эпитопной направленности [11, 13, 15]. На сегодняшний день широко распространенные иммунодиагностические средства на основе МКА к эпитопам экзополисахарида возбудителя мелиоидоза в той или иной мере характеризуются перекрестной реактивностью в отношении близкородственных непатогенных или малопатогенных буркхольдерий. По этой причине исследования, направленные на получение рекомбинантных белков — диагностических мишеней, специфичных для *B. pseudomallei*, являются перспективными [5].

Современные методологии создания иммунодиагностических систем нового поколения с успехом развиваются применительно к ряду бактериальных патогенов [6, 9]. Они основаны на технологии направленного выбора потенциальных кандидатных биополимеров бактериальных клеток и включают в себя сравнительное *in silico* исследование геномов бактерий, клонирование кодирующих последовательностей (CDS) целевых биомолекул-мишеней и получе-

ние рекомбинантных продуктов, удобных для их быстрого и безопасного накопления. Ранее нами были проведены сравнительный анализ последовательностей геномов штаммов возбудителя мелиоидоза и выявление дифференцирующих групп CDS поверхностных биополимеров [2]. Цель настоящего исследования заключалась в клонировании выбранных генов *B. pseudomallei* с последующей оптимизацией схемы очистки рекомбинантных антигенов.

Материалы и методы

В качестве источника хромосомной ДНК был использован штамм возбудителя мелиоидоза *B. pseudomallei* 56770 из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Для выделения ДНК из 24-часовой культуры *B. pseudomallei*, выращенной на LB-агаре при 37°C, использовали метод протеиназного лизиса [4]: 200 мкл свежеприготовленной бактериальной взвеси в стерильной бидистиллированной воде плотностью 2×10^9 м.к./мл смешивали с равным объемом лизирующего буфера (20 мМ Трис-НСl, 100 мМ КCl, 5 мМ MgCl₂, 0,2 мг/мл желатина, 0,9% Nonidet P-40, 0,9% Твин 20, 150 мкг/мл протеиназы К), инкубировали при 60°C 120 мин, затем при 99°C 30 мин для инактивации фермента.

Для амплификации полных нуклеотидных последовательностей генов *omp38* и *ompA/motB* были использованы известные из литературы праймеры *bpsomp38* [10] и разработанные нами оригинальные праймеры *bps4255* [1] соответственно. Все праймеры были модифицированы путем достройки с 5'-конца фосфорилированного адаптера с целью облегчения клонирования продукта.

ПЦР осуществляли в монолокусном формате на амплификаторе C1000 (Bio-Rad, США) при параметрах: 95°C — 4 мин, 35 циклов (95°C — 40 с, 57°C для праймеров *bpsomp39* или 66,2°C для праймеров *bps4255* — 30 с, 72°C — 1 мин 20 с), финальная элонгация 72°C — 10 мин. Объем реакционной смеси на одну пробу составлял 15 мкл, концентрация праймеров — 50 пМ. Для детекции продуктов амплификации использовали электрофоретическое разделение в 1,5% агарозном геле и визуализацию посредством окрашивания бромистым этидием.

Клонирование полноразмерных кодирующих последовательностей генов поверхностных биополимеров *omp38* и *ompA/motB* возбудителя мелиоидоза производили по протоколу Profinity eXact™ (Bio-Rad, США) с использованием линейного экспрессирующего вектора RIC-Ready pPAL7 и компетентных клеток штаммов *E. coli* C-Max5α и *E. coli* BL21 (DE3) (Bio-Rad, США). Специфические ампликоны и вектор лигировали в соотношении 10:1. Трансформированные бак-

терии выращивали при 37°C на L-агаре с добавлением ампициллина (100 мкг/мл) в качестве селективного агента. Плазмидную ДНК выделяли с помощью набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, Литва) согласно инструкции.

Для экспрессии целевых белков в клетках штамма-продуцента ночную культуру засеивали в LB бульон, содержащий ампициллин (100 мкг/мл) и 0,5% глюкозу, выращивали 18 ч при 37°C и интенсивной аэрации до достижения оптической плотности взвеси OD₆₀₀ = 0,5–0,7. Затем для индукции синтеза рекомбинантных белков под контролем промотора T7lac в бульон с культурой вносили изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 2 мМ и продолжали культивировать при 37°C в течение 4 ч. Бактериальную взвесь осаждали центрифугированием и обрабатывали ультразвуком в буфере (0,3 М сахароза, 10 мМ Трис-НСl, 1,5 мМ ЭДТА) с помощью прибора VCX 130 (Sonic & Materials Inc., США).

Растворимость, уровень экспрессии и степень очистки целевых белков оценивали методом SDS-PAGE в 11% полиакриламидном геле (ПААГ) с последующим окрашиванием Coomassie Brilliant Blue R-250 Dye (Thermo Fisher Scientific, Литва). Очистку рекомбинантных протеинов осуществляли хроматографическим методом, применяя технологию аффинных меток (affinity tag) по протоколу Profinity eXact™ (Bio-Rad, США).

Молекулярные массы целевых полипептидов определяли с помощью пакета Biopython 1.71 (<https://biopython.org>). Поиск линейных эпитопов исследуемых белков выполняли методом BepiPred, используя ресурс IEDB Analysis (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred>).

Результаты и обсуждение

В результате сравнительного *in silico* исследования в качестве целевых биомолекул были выбраны основной порин внешней мембраны *B. pseudomallei* Omp38, играющий важную роль в процессах транспорта низкомолекулярных метаболитов, формировании множественной антибиотикорезистентности и обладающий высокой иммуногенностью, а также видоспецифичный в отношении *B. pseudomallei* мембранный белок MotB семейства протеинов OmpA, также характеризующихся значительной потенциальной иммуногенностью. В ПЦР с использованием высокоточной полимеразы High Fidelity PCR Enzyme Mix (Thermo Scientific, США) были получены необходимые для клонирования ампликоны CDS *omp38* и *ompA/motB* размером 1100 и 1310 п.н. соответственно (рис. 1).

Ампликоны обрабатывали T4 ДНК-полимеразой (Thermo Scientific, США) для образования «липких» концов и лигировали с высокоэкспрессирующим плазмидным вектором pPAL7,

несущим детерминанту устойчивости к ампициллину, промотор T7lac и сайт инициации репликации ori pBR322. Также в составе вектора находилась нуклеотидная последовательность, кодирующая специфическую аффинную метку Profinity eXact tag, которая позволяет очистить рекомбинантный белок в системе Profinity™ (BioRad, США). Для накопления рекомбинантных плазмидных молекул лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* C-Max5α. Накопленными плазмидами трансформировали компетентные клетки *E. coli* BL21(DE3), предназначенные для высокоэффективной экспрессии рекомбинантных протеинов. Присутствие клонированных последовательностей у трансформантов подтверждали в ПЦР с исходными праймерами.

Анализ растворимости целевых протеинов показал их наличие в обеих фракциях ультразвукового дезинтеграта клеточных суспензий штаммов-продуцентов: растворимой и нерастворимой. Нами была выбрана стратегия, применяемая для очистки рекомбинантных белков из нативного клеточного дезинтеграта. По-видимому, из-за мультимерной организации протеинов стандартная процедура, предлагаемая производителем, оказалась неэффективной: электрофореграммы анализируемых фракций свидетельствовали о потерях целевого продукта на промежуточных стадиях очистки. Во избежание снижения концентрации рекомбинантного белка в элюате методика была модифицирована добавлением мочевины до конечной концентрации 2 М в лизат бактерий и детергента Nonidet P-40 до 1% в промывочный буфер. Период инку-

бации хроматографической колонки с элюирующим буфером увеличили до 20 ч. Очищенные протеины имели меньшую молекулярную массу (~15 kDa) по сравнению с ожидаемой (40,6 и 36,9 kDa для мономеров Omp38 и OmpA/MotB, соответственно), предположительно, вследствие созданных денатурирующих условий (рис. 2).

Очевидно, что полученные нами очищенные формы рекомбинантных белков представляли собой неполноразмерные полипептидные цепи. Поскольку элюирующий раствор специфично активировал связанную с N-концом аффинной метки протеазу неподвижной хроматографической фазы, в элюатах несомненно содержались N-концевые аминокислотные последовательности целевых протеинов. По-видимому, на промежуточных этапах очистки в денатурирующих условиях произошел гидролиз пептидных связей в молекулах белков. Наиболее вероятным местом таких разрывов является жесткая пептидная связь, соединяющая иминокислоту пролин с соседними аминокислотами. Атом азота пролина входит в состав жесткого кольца, что исключает возможность вращения радикала относительно связи N — СН. Таким образом, в отличие от других аминокислот, имеющих по две степени свободы, пролин, обладающий лишь одной, вносит значительный вклад в конформационную «хрупкость» молекулы.

Анализ аминокислотных последовательностей целевых протеинов показал, что пролин находится в положениях 20, 155, 212, 220, 233, 239, 252, 305, 363 белка Omp38 и 52, 65, 151, 180, 191, 208, 221, 273, 276, 320, 321, 326, 329, 340 белка OmpA/MotB.

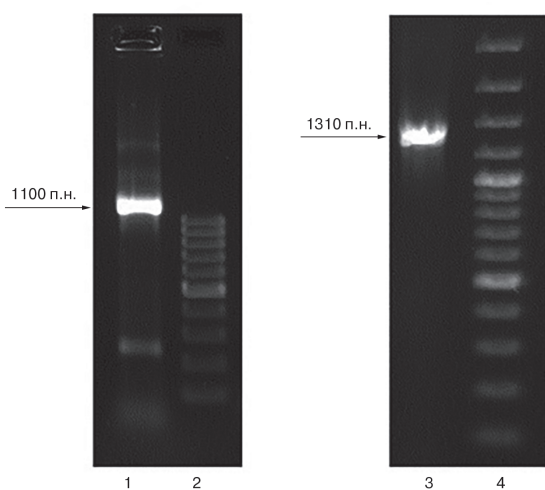


Рисунок 1. Амплификация генов поверхностных протеинов *B. pseudomallei*

Figure 1. Amplification of genes encoding *B. pseudomallei* cell surface proteins

1 — CDS omp38; 2 — ДНК-маркер молекулярных масс (100–1000 п.н.); 3 — CDS ompA/motB; 4 — ДНК-маркер молекулярных масс (100–3000 п.н.).

1 — CDS omp38; 2 — DNA Ladder (100–1000 bp); 3 — CDS ompA/motB; 4 — DNA Ladder (100–3000 bp).

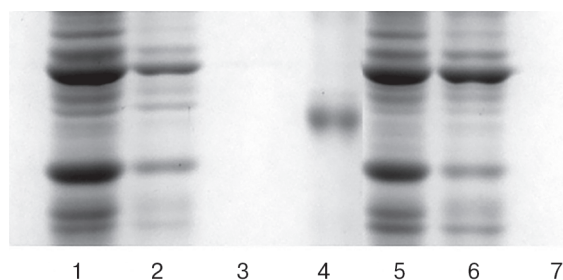


Рисунок 2. Оценка эффективности хроматографической очистки рекомбинантных белков

Figure 2. Efficiency of recombinant proteins chromatographic purification

1 — тотальный лизат клеток *E. coli* BL21(DE3) BpsOmp39; 2 — промывочная фракция очистки белка Omp38; 3 — элюат белка Omp38; 4 — маркер молекулярных масс (39,2 kDa); 5 — тотальный лизат клеток *E. coli* BL21(DE3) BpsOmpA; 6 — промывочная фракция очистки белка OmpA/MotB; 7 — элюат белка OmpA/MotB.

1 — whole cell lysate of *E. coli* BL21(DE3) BpsOmp39; 2 — wash fraction of purified Omp38; 3 — Omp38 elution; 4 — protein marker (39,2 kDa); 5 — whole cell lysate of *E. coli* BL21(DE3) BpsOmpA; 6 — wash fraction of purified OmpA/MotB; 7 — OmpA/MotB elution.

Молекулярным массам элюированных пептидов соответствовали N-концевые фрагменты белков, содержащие пролин на С-конце в положениях 155 (Omp38) и 151 (OmpA/MotB). Причем в предполагаемом месте «разлома» обоих протеинов была локализована пептидная связь между аминокислотами пролин и аспарагин. Известно, что полипептиды, содержащие последовательность Asn-Pro при воздействии аммиака подвергаются полному расщеплению по данной амидной связи [12]. В то же время пептидные связи между иными аминокислотами претерпевают либо частичное расщепление, либо остаются интактными. Поскольку применяемая нами схема очистки рекомбинантных белков включала этап обработки лизата бактерий-продуцентов мочевиной, приведенные выше данные подтверждают выдвинутое предположение относительно мест разрыва полипептидных связей в целевых продуктах.

Последовательности выбранных фрагментов размером 16,38 kDa (Omp38) и 16,47 kDa (OmpA/MotB) были оценены на предмет содержания линейных эпитопов. Результаты *in silico* анализа в графическом виде представляют собой кривые в осях координат: порог (ось ординат)/порядковый номер аминокислоты (ось абсцисс). Пики, расположенные выше линии порога, значение которого приравнивается к 0,35, и являются искомыми эпитопами, причем высота пика коррелирует со степенью антигенности аминокислот-

ной последовательности. На анализируемых полипептидах было установлено присутствие ряда участков, обладающих выраженной антигенной активностью (рис. 3).

Таким образом, получены штаммы-продуценты *E. coli* BL21(DE3) BpsOmp39 и *E. coli* BL21(DE3) BpsOmpA, несущие в составе вектора pPAL7 последовательности клонированных генов *omp38* и *ompA/motB* *B. pseudomallei*. Штаммы депонированы в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» под номерами КМ 252 и КМ 253, а также запатентованы в Федеральной службе по интеллектуальной собственности (положительное решение от 18.05.2018 г. по заявкам № 2016142890/10(068664) и 2016142892/10(068668)). Показана возможность накопления в рекомбинантных штаммах *E. coli* препаративных количеств поверхностных протеинов Omp38 и OmpA/MotB возбудителя мелиоидоза, полноразмерные формы которых можно безопасно выделить и очистить, применяя электрофоретическое разделение в ПААГ. Тем не менее очищенные полипептидные фрагменты, полученные нами посредством аффинной хроматографии и обладающие потенциальной антигенной активностью, также могут быть использованы при создании в дальнейшем библиотеки гибридом-продуцентов МКА для идентификации *B. pseudomallei*.

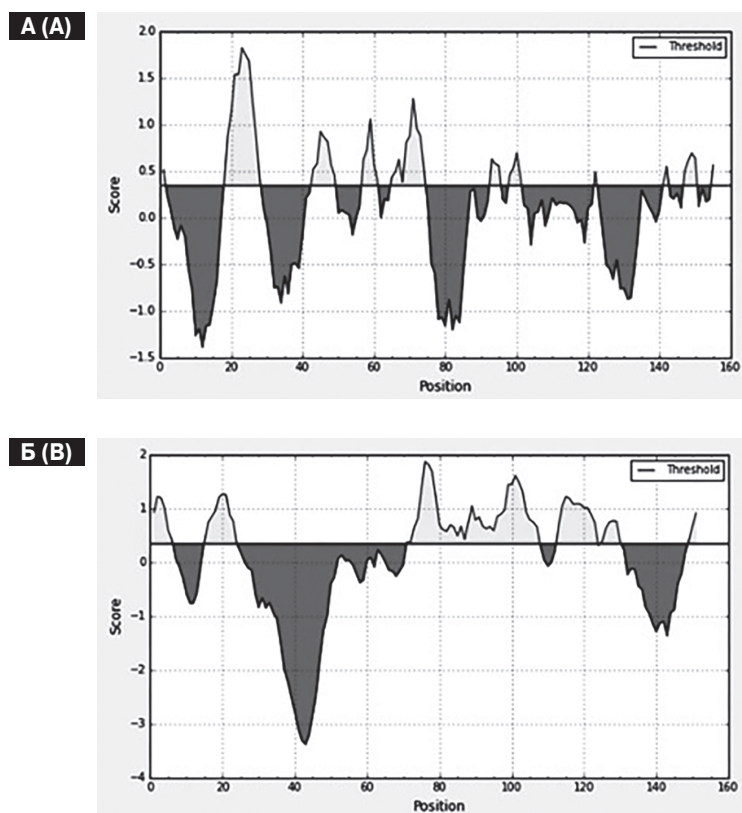


Рисунок 3. Эпитопы N-концевого фрагмента белка Omp38 (А) и N-концевого фрагмента белка OmpA/MotB (Б) *B. pseudomallei*

Figure 3. *B. pseudomallei* protein Omp38 (A) and OmpA/MotB (B) N-terminal fragment epitopes

Список литературы/References

1. Викторов Д.В., Захарова И.Б., Кузютина Ю.А., Лопастейская Я.А. Набор 5'-фосфорилированных олигонуклеотидных праймеров для амплификации методом полимеразной цепной реакции полной кодирующей последовательности гена ompA/motB Burkholderia pseudomallei. Патент РФ, 2608505, C12N1/00, C12Q1/68. 2017. [Viktorov D.V., Zakharova I.B., Kuzyutina J.A., Lopatetska J.A. Set 5'-phosphorylated oligonucleotide primers for amplification by polymerase chain reaction of the complete coding sequence of the gene ompA/motB Burkholderia pseudomallei. The patent of the Russian Federation, 2608505, C12N1/00, C12Q1/68. 2017. (In Russ.)]
2. Кузютина Ю.А., Захарова И.Б., Савченко С.С., Лопастейская Я.А., Молчанова Е.В., Викторов Д.В. Поиск потенциальных мишеней для детекции и дифференциации штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа // Вестник ВолгГМУ. 2016. № 4 (60). С. 114–117. [Kuzyutina Y.A., Zakharova I.B., Savchenko S.S., Lopatetska J.A., Molchanova E.V., Viktorov D.V. Search for potential targets for detection and differentiation the causative agents of melioidosis and glanders strains. *Vestnik VolgGMU = Journal of Volgograd State Medical University*, 2016, no. 4 (60), pp. 114–117. (In Russ.)]
3. Онищенко Г.Г., Сандакчиев Л.С., Нетесов С.В., Мартынюк Р.А. Биотерроризм: национальная и глобальная угроза // Вестник РАН. 2003. Т. 73, № 3. С. 195–204. [Onishchenko G.G., Sandakhchiev L.S., Netesov S.V., Martynuk R.A. Bioterrorism: national and global threat. *Vestnik RAN = RAS Bulletin*, 2003, vol. 73, no. 3, pp. 195–204. (In Russ.)]
4. Тетерятникова Н.Н., Захарова И.Б., Подшивалова М.В., Романова А.В., Лопастейская Я.А., Викторов Д.В., Алексеев В.В. Молекулярная детекция интегронов класса 1 у Burkholderia pseudomallei // Проблемы особо опасных инфекций. 2011. № 2 (108). С. 46–49. [Teteryatnikova N.N., Zakharova I.B., Podshivalova M.V., Romanova A.V., Lopasteiskaya Ya.A., Viktorov D.V., Alekseev V.V. Molecular detection of class 1 integrons in Burkholderia pseudomallei. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2011, no. 2 (108), pp. 46–49. (In Russ.)]
5. Храпова Н.П., Алексеев В.В. Современное состояние серодиагностики мелиоидоза // Проблемы особо опасных инфекций. 2011. № 4 (110). С. 18–22. [Khrapova N.P., Alekseev V.V. Current state of human melioidosis serodiagnostics. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2011, no. 4 (110), pp. 18–22. (In Russ.)]
6. Bielecka M.K., Devos N., Gilbert M., Hung M.C., Weynants V., Heckels J. E., Christodoulides M. Recombinant protein truncation strategy for inducing bactericidal antibodies to the macrophage infectivity potentiator protein of Neisseria meningitidis and circumventing potential cross-reactivity with human FK506-binding proteins. *Infect. Immun.*, 2015, vol. 83, no. 2, pp. 730–742. doi: 10.1128/IAI.01815-14
7. Currie B.J., Dance D.A.B., Cheng A.C. The global distribution of Burkholderia pseudomallei and melioidosis: an update. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 2008, vol. 102, pp. S1–S4. doi: 10.1016/S0035-9203(08)70002-6
8. Gauthier J., Gerome P., Defez M., Neulat-Ripoll F., Foucher B., Vitry T., Crevon L., Valade E., Thibault F.M., Biot F.V. Melioidosis in travelers returning from Vietnam to France. *Emerg. Infect. Dis.*, 2016, vol. 22, no. 9, pp. 1671–1673. doi: 10.3201/eid2209.160169
9. Reyes A.W.B., Simborio H.L.T., Hop H.T., Arayan L.T., Kim S. Molecular cloning, purification and immunogenicity of recombinant Brucella abortus 544 malate dehydrogenase protein. *J. Vet. Sci.*, 2016, vol. 17, no. 1, pp. 119–122. doi: 10.4142/jvs.2016.17.1.119
10. Siritapetawee J., Prinz H., Krittanai C., Suginta W. Expression and refolding of Omp38 from Burkholderia pseudomallei and Burkholderia thailandensis, and its function as a diffusion porin. *J. Biochem.*, 2004, vol. 384, no. 3, pp. 609–617. doi: 10.1042/BJ20041102
11. Tabll A., Abbas A.T., El-Kafrawy S., Wahid A. Monoclonal antibodies: principles and applications of immunodiagnosis and immunotherapy for hepatitis C virus. *World J. Hepatol.*, 2015, vol. 7, no. 22, pp. 2369–2383. doi: 10.4254/wjh.v7.i22.2369
12. Tarelli E., Corran P.H. Ammonia cleaves polypeptides at asparagine proline bonds. *J. Pept. Res.* 2003, vol. 62, no. 6, pp. 245–251.
13. Trivedi P., Tuteja U., Khushiramani R., Reena J., Batra H.V. Development of a diagnostic system for Burkholderia pseudomallei infections. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, vol. 28, no. 7, pp. 2465–2471. doi: 10.1007/s11274-012-1053-y
14. Workgroup, Planning. Biological and chemical terrorism: strategic plan for preparedness and response. *MMWR*, 2000, vol. 49, no. RR-4, pp. 1–26.
15. Zhao S., Shi J., Zhang C., Zhao Y., Mao F., Yang W., Bai B., Zhang H., Shi C., Xu Z. Monoclonal antibodies against a Mycobacterium tuberculosis Ag85B-Hsp16. 3 fusion protein. *Hybridoma*, 2011, vol. 30, no. 5, pp. 427–432. doi: 10.1089/hyb.2011.0047

Авторы:

Кузютина Ю.А., научный сотрудник лаборатории патогенных буркхольдерий ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия;
Захарова И.Б., к.б.н., доцент, зав. отделом микробиологии ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия;
Викторов Д.В., д.б.н., доцент, зам. директора по научно-экспериментальной работе ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия.

Authors:

Kuzyutina Yu.A., Researcher, Laboratory of Pathogenic Burkholderia, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation;
Zakharova I.B., PhD (Biology), Associate Professor, Head of the Department of Microbiology, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation;
Viktorov D.V., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Deputy Director for Scientific and Experimental Work, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation.

Поступила в редакцию 12.07.2018
 Принята к печати 11.03.2019

Received 12.07.2018
 Accepted 11.03.2019

ОЦЕНКА МЕТОДА МУЛЬТИПЛЕКСНОГО ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВОЗБУДИТЕЛЯМ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

А.Г. Полтавченко, О.В. Нечитайло, П.В. Филатов, А.В. Ерш

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», п. Кольцово,
Новосибирская область, Россия

Резюме. Первичное обследование групп населения с повышенным риском заражения инфекционными заболеваниями (ИЗ) предполагает выполнение ряда анализов с использованием моноспецифических диагностических систем и представляет собой длительную, трудоемкую и дорогостоящую процедуру. Ранее нами разработан мультиплексный тест, позволяющий оперативно и недорого проводить комплексное первичное тестирование. Создан набор, позволяющий одновременно выявлять в препаратах крови антитела к 6 возбудителям ИЗ: вирусу иммунодефицита человека, вирусам гепатитов В и С, цитомегаловирусу, *Treponema pallidum* и *Toxoplasma gondii*. Набор основан на мультиплексном дот-иммуноанализе на плоских белковых матрицах (иммуночипах) с использованием конъюгатов коллоидного золота и серебряного проявления. Он позволяет выполнять комплексный анализ при комнатной температуре в течение 70 мин и не требует высокой квалификации оператора. В настоящей статье представлены результаты лабораторных испытаний экспериментального образца мультиплексного набора в сравнении с наборами для иммуноферментного анализа (ИФА) пяти российских производителей с использованием массива из 240 образцов препаратов крови, включающих 200 клинических проб сывороток (плазмы) крови от больных ИЗ и 40 образцов плазмы доноров. Показано, что мультиплексный тест обладает чувствительностью и специфичностью анализа не менее 95%, а оптические сигналы дот-анализа хорошо коррелируют с показателями оптической плотности, полученными с использованием коммерческих наборов для ИФА, и позволяют проводить полуколичественную оценку содержания специфических антител в образце. При этом мультиплексный дот-анализ более оперативен и экономичен, по сравнению с ИФА и может выполняться во внелабораторных условиях. Набор для мультиплексного дот-иммуноанализа антител может обеспечить комплексный подход к диагностике ИЗ, значительно облегчить проведение первичного тестирования, сделать его более оперативным и доступным для пациентов.

Ключевые слова: инфекционные заболевания, первичное комплексное обследование, мультиплексный дот-иммуноанализ, чувствительность, специфичность, количественное определение.

A VERIFIED MULTIPLEXED IMMUNOASSAY FOR DETECTING ANTIBODIES AGAINST INFECTIOUS PATHOGENS

Poltavchenko A.G., Nechitaylo O.V., Filatov P.V., Ersh A.V.

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltzovo, Novosibirsk region, Russian Federation

Abstract. Baseline screening of population groups at increased risk of developing infectious diseases (ID) includes a number of ELISA-based analyses, thereby accounting for high cost laborious and time-consuming examination. Earlier we

Адрес для переписки:

Полтавченко Александр Георгиевич
630559, Россия, Новосибирская обл., п. Кольцово
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».
Тел./факс: 8 (383) 336-74-09 (служебн.); 8 (913) 735-91-74 (моб.).
E-mail: poltav@vector.nsc.ru; apoltav@gmail.com

Contacts:

Alexander G. Poltavchenko
630559, Russian Federation, Novosibirsk Region, Koltzovo,
State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector".
Phone/fax: +7 (383) 336-74-09 (office); +7 (913) 735-91-74 (mobile).
E-mail: poltav@vector.nsc.ru; apoltav@gmail.com

Библиографическое описание:

Полтавченко А.Г., Нечитайло О.В., Филатов П.В., Ерш А.В. Оценка метода мультиплексного выявления антител к возбудителям инфекционных заболеваний // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 1. С. 209–215. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-209-215

Citation:

Poltavchenko A.G., Nechitaylo O.V., Filatov P.V., Ersh A.V. A verified multiplexed immunoassay for detecting antibodies against infectious pathogens // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 209–215. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-209-215

developed a cheap multiplex assay allowing to quickly perform a complex initial testing. Here, we would like to describe a novel kit designed to simultaneously detect antibodies against the six ID pathogens in blood products (plasma, serum etc.): human immunodeficiency virus, hepatitis B and C viruses, cytomegalovirus, *Treponema pallidum* and *Toxoplasma gondii*. The kit is based on multiplex dot-immunoassay over flat protein arrays (immune chips) utilizing colloidal gold conjugates and silver development. It allows carrying out complex analysis at room temperature within 70 minutes and does not require highly-qualified personnel. In this article, the results of laboratory tests of the experimental sample of a multiplex kit are compared with commercial ELISA kits from five Russian manufacturers using an array of 240 blood product samples including 200 clinical serum (plasma) samples from patients with ID and 40 plasma samples from donors. It was shown that the multiplex test analysis has a sensitivity and specificity of at least 95%, and optical signals of the dot-assay correlate well with the optical density values obtained using commercial ELISA kits and allow a semiquantitative evaluation of the content of specific antibodies in the sample. Furthermore, multiplex analysis is quicker and cheaper compared to ELISA and can be carried out in field. The kit for multiplex dot-immunoassay of antibodies can provide a complex approach to the diagnosis of ID, significantly simplify initial testing, make it faster, more efficient and affordable for patients.

Key words: *infectious diseases, antibodies, initial complex testing, multiplex dot-immunoassay, sensitivity, specificity, quantitation.*

Введение

Мультиплексная иммунодиагностика — новое направление, предполагающее использование устройств (так называемых «белковых матриц» или «иммуночипов»), позволяющих одновременно определять в исследуемом образце множество различных аналитов. Мультиплексные анализы требуют меньше времени, реагентов и объема образца, они более информативны и экономически эффективны по сравнению с моноспецифичными тестами [14]. Несмотря на очевидные преимущества, иммуночипы не смогли пока радикально изменить диагностику, поскольку технические и эксплуатационные проблемы, препятствуют их реализации в клинических условиях [5, 6]. Большинство проблем при разработке белковых чипов обусловлено чрезвычайным разнообразием в биохимических свойствах, структуре и аффинности белков [5, 6, 10]. Значительные усилия ученых направлены на разработку мультиплексных анализов для одновременного обнаружения различных наборов клинически значимых аналитов [10], в частности для комплексного выявления маркеров инфекционных заболеваний у доноров крови и органов, хирургических больных и населения из групп риска [3, 7]. Для такого обследования может быть особо востребована мультиплексная тест-система, обеспечивающая надежное, оперативное и недорогое тестирование [3, 8, 10]. Попытки создания таких систем включали: микрожидкостные устройства [8]; иммунохроматографические системы с боковым потоком [4]; флуориметрический анализ с двойными метками [9]; суспензионные иммуночипы [15]; микроматрицы, напечатанные на поверхности дна ячеек микротитровального планшета [13]; а также иммуночипы на плоских слайдах [3]. Однако применение большинства из перечисленных тестов в клинической диагности-

ке остается проблематичным из-за сложности процессов их изготовления, значительных затрат и необходимости использования сложных устройств [5, 6, 10, 14].

Ранее мы сообщали о разработке и результатах первичных лабораторных испытаний экспериментального образца тест-системы для мультиплексного выявления в образцах сыворотки (плазмы) крови антител к 6 патогенам, способным передаваться с кровью: возбудителям сифилиса (*Treponema pallidum*) и токсоплазмоза (*Toxoplasma gondii*), цитомегаловирусу (ЦМВ), вирусам иммунодефицита человека (ВИЧ 1, 2), гепатитов В (ВГВ) и С (ВГС) [11]. Используемый нами подход позволяет совместить достоинства мультиплексного анализа с простотой изготовления и применения иммуночипов. В настоящей работе представлены результаты испытаний набора в сравнении с наборами для ИФА ведущих отечественных производителей диагностических систем с использованием массива из 240 клинических образцов.

Материалы и методы

В работе использовали следующие реагенты захвата: иммуноглобулин класса G человека (Имтек, Россия), рекомбинантный антиген HВcore вируса гепатита В (ВГВ); рекомбинантный, мозаичный антиген NC34ab вируса гепатита С (ВГС) и рекомбинантный антиген p150 цитомегаловируса (ЦМВ) (ООО «Диа ПрофМед», Украина); рекомбинантный, химерный антиген gp41+gp120+gp36 вируса иммунодефицита человека (ВИЧ 1,2) и рекомбинантный, химерный антиген *T. gondii* (Faron Biotech Inc., Китай); рекомбинантные антигены p17 и TmpA *T. pallidum* (ЗАО БТК «Биосервис», Россия).

Исследования выполняли на массиве из 240 образцов, включающих 200 клинических проб сывороток (плазмы) крови от инфекционных больных и 40 образцов плазмы доноров, сфор-

мированном специалистами ЗАО «ИмДи» (г. Новосибирск) и предоставленный для экспериментов в виде слепого набора образцов.

Экспериментальный образец набора для мультиплексного дот-иммуноанализа антител (МДИА) рассчитан на 20 анализов. Он содержит 4 модуля для выполнения 5 анализов, флаконы с компонентами проявляющей системы и CD-диск с компьютерной программой учета результатов. Каждый модуль содержит блок из 5 белковых матриц из синтетической бумаги с дискретно нанесенными реагентами захвата и аналитическую ванну, объединяющую 5 блоков из 12 ячеек, заполненных готовыми рабочими растворами и герметизированных фольгой. Вид набора и описание методологии его изготовления приведено в предыдущей публикации [11].

Методология мультиплексного анализа представляет собой дот-иммуноанализ на белковых матрицах с низкой плотностью нанесения реагентов захвата, с применением конъюгатов на основе коллоидного золота, серебряного проявления и дополнительного усиления и стабилизации оптического сигнала [12]. Анализ выполняли с объемами рабочих растворов в ячейках 0,3 мл и исследуемых образцов 15 мкл в течение 70 мин при комнатной температуре. Хронологическая схема и описание методики анализа приведены ранее [11].

Обработку данных мультиплексного анализа выполняли с применением компьютерной программы, позволяющей автоматически определять оптическую плотность в каждой зоне нанесения антигена и выражать ее в относительных единицах [процентах диапазона от положительного контроля — IgG человека (K+ = 100%) до отрицательного контроля — зоны свободной от антигенов (K- = 0%)]; а также задавать отсекаемые значения — ОП_{крит}, определенные предварительно по панели отрицательных сывороток [2].

В качестве тестов сравнения использовали наборы для ИФА: ГепаБест анти-НВс-IgG, Бест анти-ВГС, РекомбиБест антипаллидум — IgG, КомбиБест анти-ВИЧ-1+2 (АО «Вектор-Бест» (В-Бест), г. Новосибирск); Инвитролоджик «НВcore-антитела», ВГС-ДСМ, Сиф-IgG-ДС-стрип, Инвитролоджик ВИЧ-1,2-АТ, Мелиса Токсо-IgG, Инвитролоджик ЦМВ-IgG (АО «Медико-биологический союз» (МБС), г. Новосибирск); ИФА-анти-НВcore, ИФА-антипаллидум-IgG, ИФА-ВИЧ-1,2-Ат, (АО «ЭКОлаб», г. Электрогорск); ДС-ИФА-Анти-ТОКСО-Г, МилаЛаб-ИФА-АНТИ-НСV, ИФА-АНТИ-ЛЮИС, ДС-ИФА-АНТИ-ЦМВ-Г (ООО «НПО «Диагностические системы» (ДС), Нижний Новгород); ЦМВ-IgG, Токсо-IgG (ООО «ИмДи-спектр» (ИмДи), р.п. Кольцово, Новосибирской

область). ИФА выполняли в соответствии с прилагаемыми инструкциями. Результаты регистрировали на сканирующем спектрофотометре «Multiscan 310С» (Titertek, Финляндия) при $\lambda = 450$ нм.

При сравнении массива из 240 сывороток подсчитывали общее число положительных и отрицательных образцов, одинаково квалифицированных более чем половиной референс-тестов, а также количество положительных и отрицательных образцов, определенных каждым тестом. Чувствительность и специфичность по каждому маркеру и для каждого теста рассчитывали по общепринятой формуле:

$$x = \frac{\text{число правильно квалифицированных образцов}}{\text{число исследованных образцов данной квалификации}}$$

Чувствительность вычисляли по положительным, а специфичность по отрицательным образцам. Статистическую обработку и корреляционный анализ данных со статистической значимостью 95% выполняли с помощью программы «Microsoft Excel».

Результаты и обсуждение

Задачей первичного тестирования является установление факта контакта пациента с возбудителем инфекционного заболевания. В последующем, при необходимости, выполняется детальное изучение последствий такого контакта с применением других диагностических наборов и/или более сложных подтверждающих тестов [7, 10]. На практике значительная часть образцов, позитивных при первичном тестировании, в подтверждающих тестах не верифицируются [1], что указывает на вариабельность результатов, полученных в разных диагностических системах. Мы сравнивали результаты мультиплексного дот-иммуноанализа, с данными, полученными на наборах для ИФА пяти отечественных производителей (не менее 3 наборов по каждому определяемому маркеру). Сравнение проводили на массиве из 240 клинических образцов сывороток крови. Результаты, полученные с применением разных наборов для ИФА, существенно различались по величине оптических сигналов, а в ряде случаев и по качественной квалификации образцов, что, вероятно, может быть связано с использованием производителями разных иммунореагентов захвата и детекции, а также технологических приемов изготовления наборов. Следует отметить, что разная трактовка качественных результатов перечисленными наборами установлена при анализе сывороток с низким содержанием определяемых антител.

Таблица 1. Сравнительный анализ специфических антител в массиве из 240 образцов сывороток с применением коммерческих референс-наборов для ИФА и набора для мультиплексного дот-иммуноанализа (МДИА)

Table 1. A comparative analysis of detecting specific antibodies in 240 serum sample array by using commercial ELISA kits vs. multiplex dot-immunoassay (MDIA) kit

Наборы ¹ Kits ¹	Число выявленных образцов, положительных и отрицательных по содержанию антител к: Number of detected positive and negative samples relative to antibody amount:											
	ВИЧ 1,2 HIV 1,2		ВГС HCV		ВГВ HBV		<i>T. pallidum</i>		<i>T. gondii</i>		ЦМВ CMV	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Определено референс-наборам² Detected by referens-kits ²	197	43	148	92	113	127	24	210	84	156	201	39
В-Бест Vector-Best	197/197	43/43	148/148	87/92	109/113	121/127	21/24	210/210	н.о. ND	н.о. ND	н.о. ND	н.о. ND
Чувствительность, % Sensitivity, %	100		100		96		88		н.о. ND		н.о. ND	
Специфичность, % Specificity, %		100		94		95		100		н.о. ND		н.о. ND
МБС MBU	197/197	43/43	145/148	89/92	107/113	122/127	24/24	210/210	82/84	153/156	200/201	37/39
Чувствительность, % Sensitivity, %	100		98		95		100		98		99	
Специфичность, % Specificity, %		100		97		96		100		98		95
ДС DS	197/197	43/43	148/148	80/92	н.о. ND	н.о. ND	24/24	209/210	84/84	148/156	196/201	37/39
Чувствительность, % Sensitivity%	100		100		н.о. ND		100		100		98	
Специфичность, % Specificity, %		100		86		н.о. ND		99		95		95
ЭКОлаб EKOlabor	197/197	43/43	н.о. ND	н.о. ND	111/113	121/127	24/24	205/210	н.о. ND	н.о. ND	н.о. ND	н.о. ND
Чувствительность, % Sensitivity, %	100		н.о. ND		98		100		н.о. ND		н.о. ND	
Специфичность, % Specificity, %		100		н.о. ND		95		98		н.о. ND		н.о. ND
ИмДи ImDi	н.о. ND	н.о. ND	н.о. ND	н.о. ND	н.о. ND	н.о. ND	н.о. ND	н.о. ND	82/84	149/156	188/201	39/39
Чувствительность, % Sensitivity%	н.о. ND		н.о. ND		н.о. ND		н.о. ND		98		94	
Специфичность, % Specificity, %		н.о. ND		н.о. ND		н.о. ND		н.о. ND		95		100
МДИА MDIA	197/197	43/43	147/148	90/92	109/113	121/127	24/24	205/210	84/84	150/156	198/201	38/39
Чувствительность, % Sensitivity%	100		99		96		100		100		98	
Специфичность, % Specificity, %		100		98		95		98		96		97

Примечания. ¹ Аббревиатуры производителей наборов и наименования наборов приведены в разделе «Материалы и методы». ² Число проб, одинаково квалифицированных не менее чем половиной референс-наборов. Серой заливкой выделены расчетные данные (способ расчета в разделе «Материалы и методы»). Н.о. — не определяли

Notes. ¹ Abbreviation of kit manufacturers and kits names are presented in Section "Materials and Methods". ² Number of samples uniformly verified at least by half of the reference kits. Estimated data highlighted by gray shading (data processing are described in Section "Materials and Methods"). ND — not determined.

Учитывая выявленные разночтения, в обработке использовали только образцы, одинаково квалифицированные более чем половиной референс-тестов, среди которых подсчитывали количество положительных и отрицательных сывороток, определенных каждым тестом, и вычисляли чувствительность и специфичность для каждого набора. Результаты приведены в таблице 1.

Приведенные данные показывают, что дот-иммуноанализ с использованием набора для мультиплексного анализа обеспечивает чувствительность и специфичность выявления

всех антител не ниже 95% и не уступает характеристикам коммерческих наборов для ИФА.

Результаты корреляционного анализа значений оптических сигналов, полученных при выявлении антител разными тест-системами в массиве из 240 образцов сывороток, приведены в таблице 2. Данные таблицы 2 свидетельствуют о том, что величины оптических сигналов дот-иммуноанализа хорошо коррелируют с соответствующими значениями оптической плотности в тест-системах для ИФА и сопоставимы по своему значению с корреляцией данных между этими ИФА-системами.

Таблица 2. Коэффициенты корреляции значений оптических сигналов, полученных при выявлении маркеров инфекционных заболеваний разными тест-системами ($p = 0,05$)

Table 2. Correlation coefficients for optical signal values obtained by various test systems identifying infectious disease markers ($p = 0.05$)

Маркер Marker	Антитела к ВИЧ 1,2 Anti-HIV 1,2 antibodies				Антитела к вирусу гепатита В Anti-HBV antibodies				
	В-Бест V-Best	МБС MBU	ЭК Олаб EKOlabor	МДИА MDIA	В-Бест V-Best	МБС MBU	ЭКОлаб EKOlabor	МДИА MDIA	
В-Бест V-Best	1	0,84	0,65	0,86	1	0,71	0,78	0,81	
МБС MBU		1	0,90	0,90		1	0,76	0,70	
ЭКОлаб EKOlabor			1	0,70			1	0,68	
МДИА MDIA				1				1	
Маркер Marker	Антитела к <i>T. gondii</i> Anti- <i>T. gondii</i> antibodies				Антитела к цитомегаловирусу Anti-CMV antibodies				
	ИмДи ImDi	МБС MBU	ДС DS	МДИА MDIA	ИмДи ImDi	МБС MBU	ДС DS	МДИА MDIA	
ИмДи ImDi	1	0,96	0,95	0,89	1	0,52	0,50	0,49	
МБС MBU		1	0,97	0,90		1	0,81	0,72	
ДС DS			1	0,90			1	0,74	
МДИА MDIA				1				1	
Маркер Marker	Антитела к вирусу гепатита С Anti-HCV antibodies				Антитела к <i>T. pallidum</i> Anti- <i>T. pallidum</i> antibodies				
	В-Бест V-Best	МБС MBU	ДС DS	МДИА MDIA	В-Бест V-Best	МБС MBU	ДС DS	ЭКОлаб EKOlabor	МДИА MDIA
В-Бест Vector-Best	1	0,76	0,82	0,81	1	0,82	0,81	0,92	0,72
МБС MBU		1	0,91	0,90		1	0,95	0,91	0,78
ДС DS			1	0,89			1	0,93	0,79
Эколаб EKOlabor				н.о. ND				1	0,78
МДИА MDIA				1					1

Примечание. Аббревиатуры производителей наборов такие же, как в таблице 1.

Note. Abbreviations of kit manufacturers are shown as in Table 1.

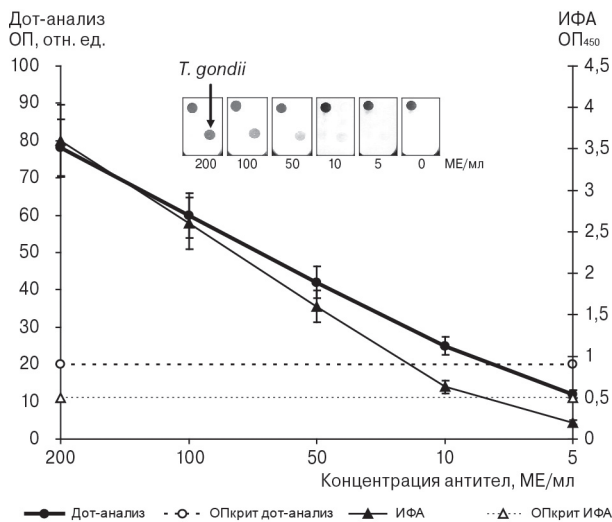


Рисунок. Зависимость оптических сигналов дот-иммуноанализа и ИФА от концентрации антител к *T. gondii* в исследуемом образце (n = 3, p = 0,05)

Figure. Optical signal (dot-immunoanalysis and ELISA)/anti-*T. gondii* antibody concentration relationship (n = 3 test samples, p = 0.05)

Примечание. В верхней части графика приведен вид иммуночипов после проведения дот-анализа, цифрами под иммуночипами обозначена концентрация специфических антител в исследуемых образцах.
Note. Middle inset: overall immunochip view after dot-analysis, numbers below immunochips indicate concentration of specific antibodies in test samples.

Хорошая корреляция значений оптических сигналов дот-анализа с результатами полуколичественных тестов для ИФА позволяет предполагать то, что мультиплексный дот-анализ также, как ИФА может использоваться для полуколичественной оценки содержания специфических антител в образце. График, построенный по результатам сравнительного анализа калибровочных образцов из набора ИФА-Токсо-IgG ЗАО «ЭКОлаб», представленный на рисунке 1, свидетельствует о том, что показатели чувствительности ИФА и дот-анализа совпадают и составляют около 10 МЕ/мл.

Ряд данных дот-анализа на этом графике в диапазоне чувствительности метода хорошо аппроксимируется прямой, что позволяет проводить ориентировочную количественную оценку содержания специфических антител в исследуемом образце. На изображении иммуночипов, приведенном в верхней части графика, оптические сигналы в диапазоне чувствительности дот-иммуноанализа выглядят как отчетливо различимые невооруженным глазом темные пятна в местах нанесения соответствующего антигена. Таким образом, качественный учет результатов анализа таких образцов может легко и надежно осуществляться визуально.

Приведенные данные свидетельствуют о возможности эффективного использования мультиплексного метода для комплексного первичного тестирования образцов крови. При этом мультиплексный тест может значительно облегчить и ускорить осуществление серомониторинга, позволяет оперативно и с небольшими трудозатратами ограничить спектр подтверждающих тестов. Метод не требует дополнительного оборудования и энергообеспечения, поэтому анализ может выполняться при оказании экстренной медицинской помощи, а также в удаленных населенных пунктах, не имеющих оборудованных лабораторий, когда операция или переливание крови должно быть выполнено неотложно, а доставка пациента или образцов крови в оснащенный медицинский пункт затруднено или невозможно.

Выводы

Метод мультиплексного дот-иммуноанализа антител к возбудителям инфекционных заболеваний обладает чувствительностью и специфичностью, не уступающими коммерческим наборам для ИФА. Он может обеспечить комплексный подход к диагностике инфекционных заболеваний и полуколичественный учет результатов анализа, значительно облегчить проведение первичного тестирования, сделать его более оперативным и доступным для пациентов.

Список литературы/References

1. Ляужева Ф.М., Тленкопачев Р.С., Жибурт Е.Б. Выбракровка доноров по маркерам инфекций в Кабардино-Балкарской Республике // Трансфузиология. 2014. № 4. С. 32–36. [Lyauzheva F.M., Tlenkopachev R.S., Zhiburt E.B. Blood donor deferral due to infections in Kabardino-Balkaria. *Transfuziologiya = Transfuziologiya*, 2014, no. 4, pp. 40–46. (In Russ.)]
2. Полтавченко А.Г., Ерш А.В., Пьянков С.А., Никонов А.М., Волков Г.Н., Кривенчук Н.А. Многопрофильная серодиагностика инфекционных заболеваний. Инструментальный учет результатов анализа // Биотехнология. 2013. № 4. С. 74–82. [Poltavchenko A.G., Ersh A.V., P'yankov S.A., Nikonov A.M., Volkov G.N., Krivenchuk N.A. The multiplex serodiagnosis of infection diseases. The tool account results of the analysis. *Biotechnologiya = Biotechnology*, 2013, no. 4, pp. 74–82. (In Russ.)]
3. Burgess S.T.G., Kenyon F., O'Looney N., Ross A.J., Kwan M.C., Beattie J.S., Petrik J., Ghazal P., Campbell J.C. A multiplexed protein microarray for the simultaneous serodiagnosis of human immunodeficiency virus/hepatitis C virus infection and typing of whole blood. *Anal. Biochem.*, 2008, vol. 382, pp. 9–15. doi: 10.1016/j.ab.2008.07.017

4. Corstjens P.L.A.M., Chen Z., Zuiderwijk M., Bau H.H., Abrams W.R., Malamud D., Niedbala R.S., Tanke H.J. Rapid assay format for multiplex detection of humoral immune responses to infectious disease pathogens (HIV, HCV, and TB). *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2007, vol. 1098, pp. 437–445. doi: 0.1196/annals.1384.016
5. Ellington A.A., Kullo I.J., Bailey K.R., Klee G.G. Antibody-based protein multiplex platforms: technical and operational challenges. *Clin. Chem.*, 2010, vol. 56, pp. 186–194. doi: 10.1373/clinchem.2009.127514
6. Hartmann M., Roeraade J., Stoll D., Templin M.F., Joos T.O. Protein microarrays for diagnostic assays. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, vol. 393, pp. 1407–1416. doi: 10.1007/s00216-008-2379-z
7. Len O., Garzoni C., Lumbreras C., Molina I., Meije Y., Pahissa A., Grossi P. Recommendations for screening of donor and recipient prior to solid organ transplantation and to minimize transmission of donor-derived infections. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2014, vol. 20, iss. 7, pp. 10–18. doi: 10.1111/1469-0691.12557
8. Lochhead M.J., Todorof K., Delaney M., Ives J.T., Greef C., Moll K., Rowley K., Vogel K., Myatt C., Zhang X.Q., Logan C., Benson C., Reed S., Schooley R.T. Rapid multiplexed immunoassay for simultaneous serodiagnosis of HIV-1 and coinfections. *J. Clin. Microbiol.*, 2011, vol. 49, pp. 3584–3590. doi: 10.1128/JCM.00970-11
9. Myyrylainen T., Talha S.M., Swaminathan S., Vainionpaa R., Soukka T., Khanna N., Pettersson K. Simultaneous detection of human immunodeficiency virus 1 and hepatitis B virus infections using a dual-label time-resolved fluorometric assay. *J. Nanobiotechnol.*, 2010, vol. 8, pp. 27–32. doi: 10.1186/1477-3155-8-27
10. Petrik J. Diagnostic applications of microarrays. *Transfus. Med.*, 2006, vol. 16, pp. 233–247. doi: 10.1111/j.1365-148.2006.00673.x
11. Poltavchenko A.G., Nechitaylo O.V., Filatov P.V., Ersh A.V., Gureyev V.N. Multiplex method for initial complex testing of antibodies to blood transmitted diseases agents. *J. Virol. Meth.*, 2016, vol. 236, pp. 231–236. doi: 10.1016/j.jviromet.2016.08.003
12. Poltavchenko A.G., Zaitsev B.N., Ersh A.V., Korneev D.V., Taranov O.S., Filatov P.V., Nechitaylo O.V. The selection and optimization of the detection system for self-contained multiplexed dot-immunoassay. *J. Immunoassay Immunochem.*, 2016, vol. 37, pp. 540–554. doi: 10.1080/15321819.2016.1174134
13. Talha S.M., Saviranta P., Hattara L., Vuorinen T., Hytönen J., Khanna N., Pettersson K. Array-in-well platform-based multiplex assay for the simultaneous detection of anti-HIV- and treponemal-antibodies, and hepatitis B surface antigen. *J. Immunol. Meth.*, 2016, vol. 429, pp. 21–27. doi: 10.1016/j.jim.2015.12.007
14. Tighe P.J., Ryder R.R., Todd I., Fairclough L.C. ELISA in the multiplex era: potentials and pitfalls. *Proteomics Clin. Appl.*, 2015, vol. 9, pp. 406–422. doi: 10.1016/j.jim.2015.12.007
15. Wong J., Sibani S., Lokko N.N., LaBaer J., Anderson K.S. Rapid detection of antibodies in sera using multiplexed self-assembling bead arrays. *J. Immunol. Meth.*, 2009, vol. 350, pp. 171–182. doi: 10.1016/j.jim.2009.08.013

Авторы:

Полтавченко А.Г., д.б.н., зав. лабораторией иммунохимической диагностики ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Нечитайло О.В., стажер-исследователь лаборатории иммунохимической диагностики ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

Филатов П.В., к.б.н., научный сотрудник лаборатории иммунохимической диагностики ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Ерш А.В., к.б.н., научный сотрудник лаборатории иммунохимической диагностики ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, п. Кольцово, Новосибирская область, Россия.

Authors:

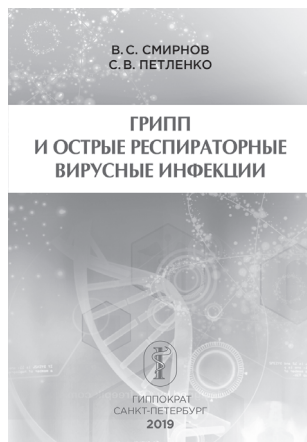
Poltavchenko A.G., PhD, MD (Biology), Head of Immunochemistry Laboratory, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltzovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Nechitaylo O.V., Trainee Researcher, Immunochemistry Laboratory, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltzovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Filatov P.V., PhD (Biology), Researcher, Immunochemistry Laboratory, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltzovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Ersh A.V., PhD (Biology), Researcher, Immunochemistry Laboratory, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltzovo, Novosibirsk Region, Russian Federation.

Грипп и острые респираторные вирусные инфекции



Авторы:

Смирнов Вячеслав Сергеевич — доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник Медико-биологического научно-производственного комплекса «Цитомед», специалист в области иммунофармакологии и медицины катастроф;

Петленко Сергей Викторович — доктор медицинских наук, руководитель отдела клинических исследований Медико-биологического научно-производственного комплекса «Цитомед», ведущий научный сотрудник ФГБУН Института токсикологии ФМБА России, специалист в области инфекционной иммунологии, иммунофармакологии и иммунологии экстремальных состояний.

Грипп и другие респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) являются самими распространенными заболеваниями человеческой популяции, поэтому актуальность данной нозологии не нуждается в доказательствах. Глобальный характер проблемы предполагает выполнение достаточно масштабных международных исследований, касающихся биологии возбудителей респираторных инфекций, индуцируемых ими патогенетических механизмов, а также вопросов профилактики и лечения этих заболеваний. Естественно, что при таком внимании к проблеме со стороны научной и медицинской общественности накопление новых знаний, как и «старение» существующих положений происходит очень быстро. Поэтому появление монографии, в которой изложены современные научные данные, касающиеся вопросов биологических характеристик таксономических групп возбудителей респираторных инфекций, патогенеза этой группы заболеваний, различных видов фармакологической профилактики и терапии, следует признать весьма своевременным и полезным. Построение книги очень хорошо сочетает логику и последовательность изложения материала.

В первой главе, посвященной биологическим свойствам возбудителей гриппа и ОРВИ достаточно подробно, но в то же время наглядно и доходчиво изложены современные данные, демонстрирующие генетические особенности и структурные элементы вирусов, определяющие их антигенность, вирулентность и характер взаимодействия с клеткой-мишенью. Такой подход готовит читателей к адекватному восприятию следующего раздела (Глава 2), в котором с использованием последних молекулярно-биологических данных рассматриваются основные аспекты патогенеза респираторных инфекций, включая все стадии процесса распознавания возбудителей, активации внутриклеточных механизмов их репликации и запуск регуляторных каскадов иммунного ответа. В дальнейшем авторами последовательно и достаточно подробно излагаются вопросы формирования специфического противовирусного ответа на уровне целостного организма с оценкой в данном процессе места и роли всех компартментов врожденного и адаптивного иммунитета.

Еще одним, несомненным достоинством данной работы, следует считать распределение научных и практических данных. Обычно в изданиях, посвященных актуальным проблемам медицинской науки, большая часть объема отводится анализу фундаментальной научной литературы, который хотя и представляет определенный познавательный интерес, но зачастую оказывается не полностью востребованным широкой аудиторией практикующих врачей. На основе клинических данных и аналитического обзора литературы авторы подробно, в том числе с учетом молекулярных механизмов, рассматривают преимущества и недостатки различных фармацевтических средств и иммунобиологических препаратов, которые зарегистрированы в России и странах ЕАЭС для профилактики и лечения гриппа и ОРВИ. При этом в рамках данного раздела, основной приоритет авторы отдают, анализу данных, полученных во время проведения рандомизированных клинических исследований, что повышает достоверность представленных материалов с позиции доказательной медицины.

Безусловно, рецензируемая работа не лишена мелких недостатков, которые практически нивелируются той пользой, которую данное издание способно принести широкой медико-биологической общественности: от студентов медицинских вузов, до ученых, занимающихся фундаментальными проблемами инфекционных заболеваний.

Рецензент — руководитель отдела иммунологии
и клеточных взаимодействий
ФГБНУ «НИИ АГиР им. Отта»
з.д.н. РФ профессор С.А. Сельков

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

Абрамова Е.Г.	107	Дробушевская А.И.	95	Лосев И.В.	67	Сенягина Н.Е.	147
Агапов Б.Л.	135	Евтушенко Е.В.	155	Лукина З.И.	183	Сергеева А.В.	147
Акмалова Г.М.	128	Епифанова Н.В.	57	Маничева О.А.	173	Старостина Н.М.	76
Алейник Д.Я.	87	Ерш А.В.	209	Мезенцева Е.А.	9	Теплякова О.В.	95
Алексеев А.Б.	147	Живцов О.П.	87	Миנדлина А.Я.	193	Терлецкий А.В.	155
Амосова И.В.	47	Журавлев В.Ю.	173	Мирсаяпова И.А.	128	Тимошичева Т.А.	47
Ахмерова Л.Г.	155	Заболотных Н.В.	173	Митрофанов В.Н.	87	Тихонова М.А.	76
Базыкина Е.А.	183	Забродская Я.А.	47	Морозова О.В.	57	Троценко О.Е.	183
Балахонцева Л.А.	183	Захарова И.Б.	203	Мотова А.И.	95	Туркутюков В.Б.	183
Беленюк В.Д.	115	Здзитовецкий Д.Э.	95	Нечитайло О.В.	209	Тутельян А.В.	39
Беспярых Ю.А.	173	Зиньковская С.В.	183	Никифоров А.К.	107	Тыринова Т.В.	76
Борисенко О.В.	39	Иванова М.В.	193	Новикова Н.А.	57	Ушанова А.В.	193
Борисов А.Г.	115	Ивао Я.	95	Олейник Е.А.	76	Филатов П.В.	209
Бруснигина Н.Ф.	147	Ильина Е.Н.	173	Останин А.А.	76	Фоменко В.В.	183
Бугоркова С.А.	135	Исакова-Сивак И.Н.	95	Первова О.В.	115	Хайруллина Р.М.	128
Будай Г.И.	183	Камшилова В.В.	67	Перьянова О.В.	95	Хасыкова Б.А.	135
Бутова Л.В.	183	Клюева С.Н.	135	Петухова Г.Д.	67	Хохлова О.Е.	95
Бутина Т.Ю.	147	Ковалишена О.В.	147	Полибин Р.В.	193	Черданцев Д.В.	115
Варнаевская Л.В.	183	Кожевников В.А.	107	Полтавченко А.Г.	209	Черных Е.Р.	76
Викторов Д.В.	203	Конушева С.В.	135	Послова Л.Ю.	147	Чернышева Н.Д.	128
Винник Ю.С.	95	Котова В.О.	183	Поткина Н.К.	95	Чечулина М.А.	183
Виноградова Т.И.	173	Кравцов А.Л.	107, 135	Прислгина Д.А.	162	Чуйкин С.В.	128
Витовская М.Л.	173	Крапивкин А.И.	183	Ронь Г.И.	128	Шестопапов А.В.	39
Гаврилова Ю.К.	107	Кудрявцев И.В.	115	Рубцова Ю.П.	87	Шитиков Е.А.	173
Генералов С.В.	107	Кудрявцева О.М.	135	Руденко Л.Г.	67	Шкарин В.В.	147
Гончарова А.Ю.	135	Кузнецова Е.К.	9	Савочкина А.Ю.	9	Щербакова С.А.	135
Гуляев А.С.	173	Кузютина Ю.А.	203	Савченко А.А.	115	Ямамото Т.	95
Дворников А.С.	39	Куличенко А.Н.	162	Савченко С.П.	135	Янович О.А.	183
Догондзе М.З.	173	Леплина О.Ю.	76	Санджиев Д.Н.	135		
Долгушин И.И.	9	Ломакина Е.А.	183	Сашина Т.А.	57		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

адаптивный иммунитет	9	иммунный статус	128	распространенность	183
аденовирус	47	иммуноглобулины	128, 135	регистрация	193
ангиогенез	39	иммунорегуляторные функции	9	рекомбинантный антиген	203
антибиотикорезистентность	95	иммуноферментный анализ	47	российские ротавирусы	57
антигенные эпитопы	57	иммунофлуоресцентный анализ	47	синдром диабетической стопы	95
антирабическая сыворотка	107	инфекции, связанные с оказанием		слизистая оболочка рта	128
антирабический иммуноглобулин	107	медицинской помощи	193	смертность	193
апоптоз	39	инфекционные заболевания	209	созревание	87
аутоиммунный тиреоидит	155	исход заболевания	115	сочетанное инфицирование	183
вакцинация	67, 135	киста щитовидной железы	155	специфичность	209
вакцины	57	количественное определение	209	Т-клетки	135
вирулентность	173	контроль биопрепаратов	107	Т-клеточный ответ	76
вирус бешенства	107	корреляция	135	Т-лимфоциты	115
вируснейтрализующая активность	107	красный плоский лишай	128	токсическое поражение печени	147
вирусные гепатиты	147	кровепаразитарная		Т-регуляторные клетки	115
вирусный гепатит В	183	(гемоспоридийная) инфекция	155	трефиловы факторы	39
ВИЧ-инфекция	183	Крымская геморрагическая		туберкулез	173
внутрибольничные		лихорадка	162	тumor-ассоциированные	
инфекции	193	melioidosis	203	нейтрофилы	9
внутриутробные		метициллинрезистентные <i>S. aureus</i>	95	узловой зоб	155
инфекции	193	микобактерии	173	фенотипирование	87
воспаление	9, 39	микробиота	95	хронический остеомиелит	87
гексон	47	молекулярная эпидемиология	183	цитокины	135
гнойно-некротические осложнения	95	молекулярно-генетические		цитотоксические Т-лимфоциты	115
грипп	67	особенности	95	чувствительность	209
гриппозные вакцины	67	моноклональные антитела	47	штамм-продуцент	203
Дальневосточный федеральный		мультиплексный dot-иммуноанализ	209	эпитоп	203
округ	183	мышинные модели	173	A (H5N2)	67
дендритные клетки	76, 87	нейтрофильные гранулоциты	9	Beijing B0/W14	173
дерматоз	128	онкогенез	39	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	203
диагностика	47	острый лимфобластный лейкоз	147	CD-рецепторы	87
дооперационный период	115	патогенез	128	Core-антиген	76
желудочно-кишечный тракт	39	первичное комплексное обследование	209	G9	57
живая аттенуированная гриппозная		перитонит	115	HCV-инфекция	76
вакцина	67	послеоперационное лечение	115	HGV	147
жизненный цикл клещей		посттрансфузионный гепатит	147	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	173
<i>Hyalomma marginatum</i>	162	прайм-буст иммунизация	67	NS3-антиген	76
заболеваемость	193	препараты крови	147	Omp38	203
заболеваемость населения	162	проточная цитометрия	107	OmpA	203
изменения климата	162	рак	9	<i>Staphylococcus aureus</i>	87
иммунный ответ	135			TTV	147

Иллюстрации к статье «Созревание *in vitro* дендритных клеток здоровых лиц и пациентов с хроническим остеомиелитом, вызванным *Staphylococcus aureus*» (авторы: Ю.П. Рубцова, Д.Я. Алейник, О.П. Живцов, В.Н. Митрофанов) (с. 87–94)

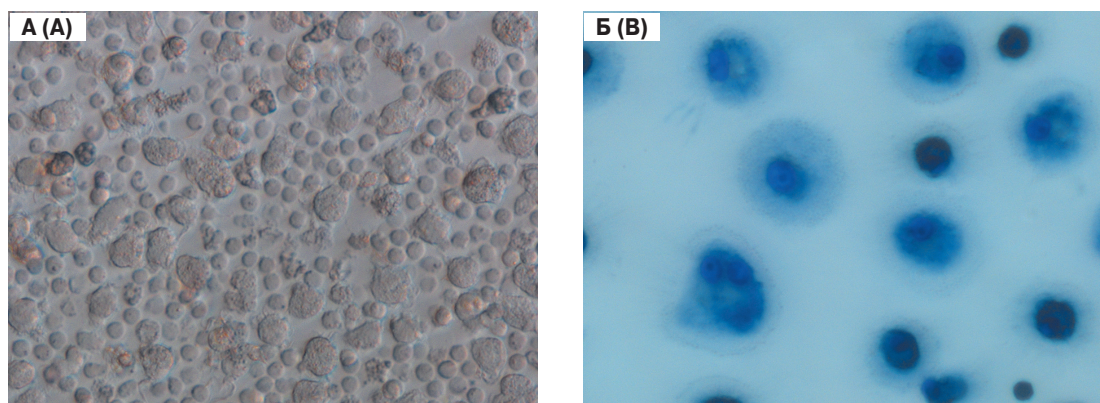


Рисунок 1. Незрелые дендритные клетки до внесения стимуляторов созревания

Figure 1. Microscopic analysis of immature dendritic cells prior adding a stimulating factor cocktail

Примечания. А — нативный препарат (×400); Б — препарат, окрашенный азур-эозином (×630).

Notes. A — native sample (×400); B — sample stained with azur-eosin (×630).

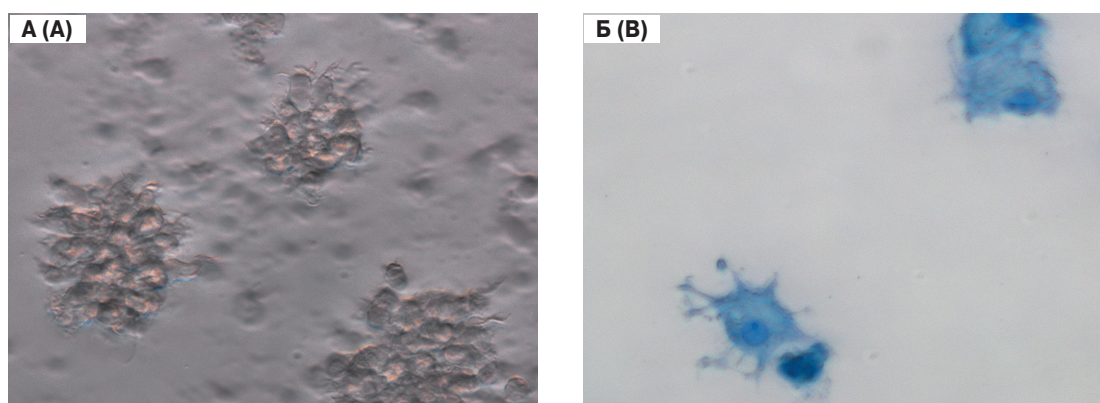


Рисунок 2. Зрелые дендритные клетки после внесения стимуляторов созревания

Figure 2. Microscopic analysis of mature dendritic cells added with a stimulating factor cocktail

Примечания. А — нативный препарат (×400); Б — препарат, окрашенный азур-эозином (×630).

Notes. A — native sample (×400), B — sample stained with azur-eosin (×630).

Подписной индекс:
Роспечать – 95001
Пресса России – 41392

