

ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

июль–сентябрь
2019, том 9

№ 3–4

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.

Подписано в печать 23.09.2019 г. Формат 60 x 90 1/8.
Печать офсетная. Усл.-печ. л. 25.
Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.).
Заказ № 1333

© Инфекция и иммунитет
© Северо-Западное отделение медицинских наук, 2019
© НИИЭМ имени Пастера, 2019
© СПб РО РААКИ, 2019

Russian Journal of Infection and Immunity

(Infektsiya i immunitet)

July–September

2019, volume 9

No. 3–4

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
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 23.09.2019. Print format 60 x 90 1/8.
Offset printing. Printed sheets 25.
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

Лямин А.В., Жестков А.В., Никитина Т.Р., Подсевалов В.С., Трофимов А.Р., Исмагуллин Д.Д.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДОВ *NOCARDIA* И *GORDONIA* 429

Бывалов А.А., Конышев И.В.

АДГЕЗИНЫ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* 437

Samara J., Antipova A.Yu., Bichurina M.A., Zarubaev V.V., Magassouba N., Lavrentieva I.N.

IMPLEMENTATION OF THE PROGRAM OF MEASLES ELIMINATION IN THE WHO AFRICAN REGION 449

Успенский Ю.П., Барышникова Н.В., Ермоленко Е.И., Суворов А.Н., Сварваль А.В.

ВАКЦИНА ПРОТИВ *HELICOBACTER PYLORI*: МИФ ИЛИ РЕАЛЬНОСТЬ? 457

Голицына Л.Н., Нгуен Т.Т.Т., Романенкова Н.И., Лыонг М.Т., Ву Л.Т., Канаева О.И., Бичурина М.А., Новикова Н.А.

ЭНТЕРОВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ В СОЦИАЛИСТИЧЕСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ ВЬЕТНАМ 467

Оригинальные статьи

Брезгин С.А., Костюшева А.П., Смирский В.Н., Волчкова Е.В., Чистяков Д.С., Костюшев Д.С., Чуланов В.П.

ПОДАВЛЕНИЕ ЦИКЛА ВИРУСА ГЕПАТИТА В ПОД ДЕЙСТВИЕМ НУКЛЕОЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ CRISPR/Cas9 И БЕЛКА НВх 476

Цыбалова Л.М., Степанова Л.А., Шуклина М.А., Коротков А.В., Зайцева М.В., Грищенко В.И., Котляров Р.Ю.

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА НА ГРИППОЗНУЮ ИНФЕКЦИЮ У ЖИВОТНЫХ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ УНИВЕРСАЛЬНОЙ ВАКЦИНОЙ 485

Фирстова В.В., Карцева А.С., Силкина М.В., Марьин М.А., Мунтян Я.О., Рябко А.К., Шемякин И.Г.

ВЫЯВЛЕНИЕ КЛЕТОК ПАМЯТИ У ЕЖЕГОДНО РЕВАКЦИНИРУЕМЫХ ДОНОРОВ ВАКЦИНОЙ СИБИРЕЯЗВЕННОЙ ЖИВОЙ 495

Абдурасулова И.Н., Тарасова Е.А., Кудрявцев И.В., Негореева И.Г., Ильвес А.Г., Серебрякова М.К., Ермоленко Е.И., Ивашкова Е.В., Мацулевич А.В., Татаринов А.Е., Столяров И.Д., Клименко В.М., Суворов А.Н.

СОСТАВ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА И ПОПУЛЯЦИЙ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ Th-КЛЕТОК У ПАЦИЕНТОВ С РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ 504

Дрыгина Л.Б., Эллингиди В.Н., Бардышева Н.А., Богословский М.М.

НЕИНВАЗИВНЫЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ МАРКЕРЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭРАДИКАЦИИ *HELICOBACTER PYLORI* 523

Пасечник О.А., Вязовая А.А., Дымова М.А., Блох А.И., Стасенко В.Л., Татаринцева М.П., Мокроусов И.В.

ИСХОДЫ ЗАБОЛЕВАНИЯ ТУБЕРКУЛЕЗОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНОТИПА *Mycobacterium tuberculosis* 531

Савченко А.А., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Беленюк В.Д.

ФЕНОТИП НК-КЛЕТОК В ДИНАМИКЕ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОГО ПЕРИОДА У БОЛЬНЫХ ПЕРИТОНИТОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИСХОДА ЗАБОЛЕВАНИЯ 539

Саркисян Н.Г., Катаева Н.Н., Тузанкина И.А., Меликян С.Г., Зурочка В.А., Зурочка А.В.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ СПРЕЯ НА ОСНОВЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКОГО ГЕНЕРАЛИЗОВАННОГО ПАРОДОНТИТА 549

Леонова Г.Н., Майстровская О.С., Лубова В.А., Санина Н.М.

КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ НА ИНФЕКЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА 559

Степанова Т.Ф., Ребещенко А.П., Бакштановская И.В., Мазуркевич В.В.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ СИСТЕМЫ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ МЕДИЦИНСКОЙ ОРГАНИЗАЦИИ 568

Краткие сообщения

Ногойбаева К.А., Тобокалова С.Т., Бекенова Д.С., Назарбаева Ж.Н.

ХРОНИЧЕСКИЙ ГЕПАТИТ В БЕЗ И С ДЕЛЬТА-АГЕНТОМ В КЫРГЫЗСТАНЕ (ЭПИДЕМИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ, КЛИНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ) 577

Контаров Н.А., Архарова Г.В., Гришунина Ю.Б., Гришунина С.А., Юминова Н.В.

ОЦЕНКА И ПРОГНОЗ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ОРВИ-ГРИППОМ С ПОМОЩЬЮ МАТЕМАТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ SIR+A НА ТЕРРИТОРИИ МОСКВЫ В 2016 ГОДУ 583

Синицын Б.Ф.

К ОБНАРУЖЕНИЮ ПСОРИАТИЧЕСКОГО АНТИГЕНА КАК НЕКОТОРОГО АНАЛОГА ИНФЕКЦИОННЫХ ПРИОННЫХ БЕЛКОВ 589

Ибрагимова М.К., Цыганов М.М., Чуруксаева О.Н., Коломиец Л.А., Литвяков Н.В.

АНАЛИЗ ВЫЖИВАЕМОСТИ БОЛЬНЫХ ВПЧ-АССОЦИИРОВАННЫМ И ВПЧ-НЕГАТИВНЫМ РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ 595

Ильинских Н.Н., Ильинских Е.Н., Замятина Е.В., Ли С.В.

МОНИТОРИНГ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ МЕТОДОМ МИКРОЯДЕРНОГО АНАЛИЗА КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ КЛЕЩЕВЫМ ЭНЦЕФАЛИТОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЛИЧИЯ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗЫ 600

Смердова М.А., Топтыгина А.П., Андреев Ю.Ю., Сенникова С.В., Зеткин А.Ю., Клыкова Т.Г., Беяков С.И.

ГУМОРАЛЬНЫЙ И КЛЕТОЧНЫЙ ИММУНИТЕТ К АНТИГЕНАМ ВИРУСОВ КОРИ И КРАСНУХИ У ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ 607

Бурова Н.А., Солтыс П.А., Жаркин Н.А., Селихова М.С., Свиридова Н.И., Белан Э.Б.

ДИНАМИКА СЫВОРОТОЧНОГО УРОВНЯ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОК С ОСТРЫМИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ОРГАНОВ МАЛОГО ТАЗА НА РАННИХ СРОКАХ КОНСЕРВАТИВНОГО ЛЕЧЕНИЯ 612

Правила для авторов 617

Авторский указатель 620

Предметный указатель 620

CONTENTS

Reviews

- Lyamin A.V., Zhestkov A.V., Nikitina T.R., Podsevalov V.S., Trofimov A.R., Ismatullin D.D.*
GENERAL CHARACTERISTICS AND CLINICAL SIGNIFICANCE OF NOCARDIA AND GORDONIA GENERA 429
- Byvalov A.A., Konyshov I.V.*
YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS-DERIVED ADHESINS 437
- Камава Дж., Антипова А.Ю., Бичурин М.А., Зарубаев В.В., Магассуба Н'Ф., Лаврентьева И.Н.*
ОСУЩЕСТВЛЕНИЕ ПРОГРАММЫ ЭЛИМИНАЦИИ КОРИ В АФРИКАНСКОМ РЕГИОНЕ ВОЗ 449
- Uspenskiy Yu.P., Baryshnikova N.V., Ermolenko E.I., Suvorov A.N., Svarval A.V.*
ANTI-HELICOBACTER PYLORI VACCINE: MITH OR REALITY? 457
- Golitsyna L.N., Nguyen T.T.T., Romanenkova N.I., Luong M.T., Vo L.T., Kanaeva O.I., Bichurina M.A., Novikova N.A.*
ENTEROVIRUS INFECTION IN THE SOCIALIST REPUBLIC OF VIETNAM 467

Original articles

- Brezgin S.A., Kostyusheva A.P., Simirsky V.N., Volchkova E.V., Chistyakov D.S., Kostyushev D.S., Chulanov V.P.*
SUPPRESSION OF HEPATITIS B VIRUS BY A COMBINED ACTIVITY OF CRISPR/Cas9 AND HBx PROTEINS 476
- Tsybalova L.M., Stepanova L.A., Korotkov A.V., Shuklina M.A., Zaitseva M.V., Grishchenko V.I., Kotlyarov R.Yu.*
FEATURES OF IMMUNE RESPONSE AGAINST INFLUENZA INFECTION IN ANIMALS VACCINATED WITH RECOMBINANT CROSS-PROTECTIVE VACCINE 485
- Firstova V.V., Kartseva A.S., Silkina M.V., Marin M.A., Muntian Ia.O., Ryabko A.K., Shemyakin I.G.*
DETECTING SPECIFIC MEMORY T AND B CELLS IN VOLUNTEERS ANNUALLY REVACCINATED WITH LIVE ANTHRAX VACCINE 495
- Abdurasulova I.N., Tarasova E.A., Kudryavtsev I.V., Negoreeva I.G., Ilves A.G., Serebryakova M.K., Ermolenko E.I., Ivashkova E.V., Matsulevich A.V., Tatarinov A.E., Stoliarov I.D., Klimenko V.M., Suvorov A.N.*
INTESTINAL MICROBIOTA COMPOSITION AND PERIPHERAL BLOOD Th CELL SUBSETS IN PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS 504
- Drygina L.B., Ellenidi V.N., Bardysheva N.A., Bogoslovskiy M.M.*
NON-INVASIVE LABORATORY MARKERS ASSESSING EFFICACY OF HELICOBACTER PYLORI ERADICATION THERAPY 523
- Pasechnik O.A., Vyazovaya A.A., Dymova M.A., Blokh A.I., Stasenko V.L., Tatarintseva M.P., Mokrousov I.V.*
TUBERCULOSIS OUTCOMES RELATED TO THE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS GENOTYPE 531
- Savchenko A.A., Borisov A.G., Kudryavcev I.V., Belenjuk V.D.*
THE PHENOTYPE OF NK-CELLS IN THE DYNAMICS OF THE POST-OPERATIVE PERIOD IN PATIENTS WITH PERITONITIS IN DEPENDING ON THE OUTCOME OF THE DISEASE 539
- Sarkisian N.G., Kataeva N.N., Tuzankina I.A., Melikyan S.G., Zurochka V.A., Zurochka A.V.*
ASSESSING EFFICIENCY OF SYNTHETIC PEPTIDE-CONTAINING SPRAY IN COMBINATION THERAPY OF CHRONIC GENERALIZED PERIODONTITIS 549
- Leonova G.N., Majstrovskaya O.S., Lubova V.A., Sanina N.M.*
COMPREHENSIVE ASSESSMENT OF SPECIFIC ANTIBODIES ON INFECTIOUS ACTIVITY OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS 559
- Stepanova T.F., Bakshantovskaya I.V., Rebishchenko A.P., Mazurkevich V.V.*
ASSESSING EFFICIENCY OF EPIDEMIOLOGICAL SECURITY SYSTEM FOR THE MEDICAL ORGANIZATION 568

Short communications

Nogoibaeva K.A., Tobokalova S.T., Bekenova D.S., Nazarbaeva J.N.

**CHRONIC HEPATITIS B ASSOCIATED WITHOUT/WITH A DELTA AGENT IN KYRGYZSTAN
(EPIDEMIOLOGICAL SITUATION, CLINICAL FEATURES) 577**

Kontarov N.A., Arkharova G.V., Grishunina Yu.B., Grishunina S.A., Yuminova N.V.

**SIR+A MATHEMATICAL MODEL FOR EVALUATING AND PREDICTING 2016–2017 ARVI-INFLUENZA
INCIDENCE BY USING ON THE MOSCOW TERRITORY 583**

Sinitsyn B.F.

DETECTING A PSORIATIC ANTIGEN ANALOGOUS TO INFECTIOUS PRION PROTEINS 589

Ibragimova M.K., Tsyganov M.M., Churuksaeva O.N., Kolomiets L.A., Litviakov N.V.

ASSESSING SURVIVAL RATE OF HPV-POSITIVE AND HPV-NEGATIVE CERVICAL CANCER PATIENTS 595

Ilyinskikh N.N., Ilyinskikh E.N., Zamyatina E.V., Li S.V.

**MONITORING CYTOGENETIC INSTABILITY BY MICRONUCLEUS ASSAY OF CELLS IN PATIENTS
WITH TICK-BORNE ENCEPHALITIS DEPENDING ON GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE GENES
GENOTYPE VARIANTS 600**

Smerdova M.A., Toptygina A.P., Andreev Yu.Yu., Sennikova S.V., Zetkin A.Yu., Klykova T.G., Belyakov S.I.

**HUMORAL AND CELLULAR IMMUNITY TO MEASLES AND RUBELLA VIRUS ANTIGENS
IN HEALTHY SUBJECTS 607**

Burova N.A., Soltys P.A., Zharkin N.A., Selikhova M.S., Sviridova N.I., Belan E.B.

**DYNAMICS OF PROINFLAMMATORY CYTOKINE SERUM LEVELS IN PATIENTS WITH ACUTE INFLAMMATORY
DISEASES OF PELVIC ORGANS IN THE EARLY STAGES OF CONSERVATIVE TREATMENT 612**

Instructions to Authors 617

Author index 620

Subject index 620

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДОВ *NOCARDIA* И *GORDONIA*

А.В. Лямин, А.В. Жестков, Т.Р. Никитина, В.С. Подсевалов, А.Р. Трофимов, Д.Д. Исмагуллин

ФГБУ ВО Самарский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Самара, Россия

Резюме. В последнее время в современной медицинской микробиологии довольно большое внимание уделено изучению семейств *Actinomycetaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Nocardiaceae*, *Gordoniaceae*. Представители семейства *Mycobacteriaceae* все чаще становятся объектом научного и практического интереса, в то время как бактерии из таких семейств, как *Nocardiaceae* и *Gordoniaceae* остаются малоизученными, несмотря на то что в практической микробиологии появляются новые методы, позволяющие проводить более точную идентификацию микроорганизмов. По данным современной классификации, род *Nocardia* включает в себя свыше 80 видов, большинство из которых редко вызывают заболевания у людей. Наиболее часто представители рода *Nocardia* вызывают поражения бронхолегочной системы, однако возможно развитие патологических процессов других локализаций. Такая же ситуация складывается с инфекционными поражениями, обусловленными представителями рода *Gordonia*. Представители рода *Gordonia* ранее часто неправильно идентифицировались в качестве других актиномицет или микобактерий, но использование 16S рРНК секвенирования позволило значительно улучшить идентификацию этих микроорганизмов. В настоящее время число микроорганизмов, имеющих потенциальное клиническое значение среди аэробных актиномицет возрастает. Так же как и при нокардиозах, первичные и вторичные иммунодефициты различной этиологии играют первостепенную роль в развитии патологических процессов, связанных с гордониями. Однако дополнительным фактором риска может быть патологические состояния, связанные с попаданием в организм человека инородных тел, колонизированных данными микроорганизмами. Наиболее часто представители рода *Nocardia* вызывают поражения в бронхолегочной системе, однако возможно развитие патологии и других локализаций. Половина всех случаев легочного нокардиоза сопровождается патологическими процессами внелегочной локализации. Только около 20% пациентов имеют внелегочную форму заболевания, которая обычно возникает при распространении возбудителя гематогенно или другими путями, однако при них также характерно первичное легочное поражение. Такая же ситуация складывается с инфекционными поражениями, обусловленными представителями рода *Gordonia*. В настоящее время число микроорганизмов, имеющих потенциальное клиническое значение, среди аэробных актиномицет возрастает, в связи с этим все чаще в научной литературе поднимается вопрос об их роли в патологических процессах различной этиологии. Сообщений об инфекциях, связанных с бактериями из рода *Gordonia*, относительно мало, что возможно связано с тем, что большое количество микроорганизмов может быть не выделено из клинического материала или они могут быть ошибочно идентифицированы как микобактерии или нокардии. Так же как и при нокардиозах, иммунодефициты различной этиологии играют первостепенную роль в развитии патологических процессов, связанных с гордониями. Однако дополнительным фактором риска могут быть патологические состояния, связанные

Адрес для переписки:

Лямин Артем Викторович
443079, Россия, г. Самара, ул. Гагарина, 18,
Самарский государственный медицинский университет.
Тел.: 8 (846) 260-33-61.
E-mail: avlyamin@rambler.ru

Contacts:

Artem V. Lyamin
443079, Russian Federation, Samara, Gagarin str., 18,
Samara State Medical University.
Phone: +7 (846) 260-33-61.
E-mail: avlyamin@rambler.ru

Библиографическое описание:

Лямин А.В., Жестков А.В., Никитина Т.Р., Подсевалов В.С., Трофимов А.Р., Исмагуллин Д.Д. Общая характеристика и клиническое значение представителей родов *Nocardia* и *Gordonia* // Инфекция и иммунитет. 2019, т. 9, № 3–4. С. 429–436. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-429-436

Citation:

Lyamin A.V., Zhestkov A.V., Nikitina T.R., Podsevalov V.S., Trofimov A.R., Ismatullin D.D. General characteristics and clinical significance of *Nocardia* and *Gordonia* genera // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 3–4, pp. 429–436. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-429-436

с попаданием в организм человека инородных тел, колонизированных данными микроорганизмами. В ряде публикаций описано этиологическое значение гордоний при развитии холицистита, гранулематозного поражения кожи, абсцесса века, других мягких тканей, гранулематозного мастита, абсцесса мозга и менингита, а также наружного отита, бронхита, эндокардита и медиастенита. Помимо этого, все эти микроорганизмы могут вызвать бактериемию, связанную с использованием центрального венозного катетера. И в связи с появлением новых методов идентификации, увеличением количества иммунокомпрометированных пациентов, и, как следствие, и выявлением новых случаев заболеваний, вызванных представителями семейств *Nocardiaceae* и *Gordoniaceae*, интерес к данным группам микроорганизмов будет только расти.

Ключевые слова: *нокардии, гордонии, клиническое значение, классификация, антибиотикорезистентность.*

GENERAL CHARACTERISTICS AND CLINICAL SIGNIFICANCE OF *NOCARDIA* AND *GORDONIA* GENERA

Lyamin A.V., Zhestkov A.V., Nikitina T.R., Podsevalov V.S., Trofimov A.R., Ismatullin D.D.

Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

Abstract. Over the last years, an increasing attention in modern medical microbiology has been paid to examining *Actinomycetaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Nocardiaceae*, *Gordoniaceae* sps. Members of the *Mycobacteriaceae* family are increasingly examined in research and real-life practice, whereas bacteria belonging to families such as *Nocardiaceae* and *Gordoniaceae* remain poorly investigated despite novel methods emerging in practical microbiology that allow to more accurately identify microorganisms. According to the current classification, the genus *Nocardia* includes over 80 species, most of which rarely result in human disease development. Most often, members of the genus *Nocardia* cause lesions in bronchopulmonary system, which, however, may also cause development of pathological processes in other anatomical sites. Likewise, members of the genus *Gordonia* may also trigger infectious lesions in human, which were previously often incorrectly identified as other actinomycetes or mycobacteria. Owing to use of 16S rRNA sequencing, it substantially improved identification of these bacteria. Currently, an increasing number of microorganisms with potential clinical significance has been recorded. In addition, similar to nocardiosis, diverse primary and secondary immunodeficiencies play a primary role in gordonii-associated development of pathological processes. However, an additional risk factor may be represented by pathological conditions associated with ingestion of foreign bodies colonized by such microorganisms. Most often, members the genus *Nocardia* cause lesions in the bronchopulmonary system able, however, affect other anatomical areas. Half of all cases of pulmonary nocardiosis are accompanied by pathological processes of extrapulmonary localization, whereas as low as 20% of patients manifest with extrapulmonary form of the disease usually occurring when the pathogen spreads hematogenously or via other routes also highlighted by primary pulmonary lesion. Moreover, members of the genus *Gordonia* may result in similar infectious lesions. Currently, the number of aerobic actinomycetes of potential clinical significance is increasing that may be due to their role in diverse pathological processes of various etiologies, which have been more often reported in scientific publications. Few reports regarding infections caused by the genus *Gordonia* are available which may be due to a paucity of microorganisms isolated from clinical material or false identification as mycobacteria or *Nocardia*. Similar to nocardiosis, diverse immunodeficiencies play a primary role in the development of pathological processes associated with *Gordonia*. However, an additional risk factor may be linked to pathological conditions associated with the ingestion of foreign bodies colonized by these microorganisms. Available publications allow to underline etiological significance of *Gordonia* in development of cholecystitis, granulomatous skin lesions, eyelid abscess of other soft tissues, granulomatous mastitis, brain abscess and meningitis, as well as external otitis, bronchitis, endocarditis and mediastinitis. In addition, all these microorganisms can cause bacteremia associated with use of a central venous catheter. Owing to emergence of new detection methods as well as elevated rate of immunocompromised patients, and subsequently increased amount of new cases caused by members of the *Nocardiaceae* and *Gordoniaceae* families, an interest they rise will grow progressively.

Key words: *Nocardia, Gordonia, clinical significance, classification, antibiotic resistance.*

Таксономическое положение и общая характеристика представителей родов *Nocardia* и *Gordonia*

В соответствии с классификацией, приведенной в Определителе бактерий Берджи (девятое издание, редакция 1997 г.), актиномицеты относятся к грамположительным бактериям, способным образовывать гифы, формирующие

мицелий, либо распадающиеся на кокковидные и палочковидные элементы, некоторые представители имеют жгутики. В связи со значительным разнообразием представителей актиномицет в классификации Берджи они представлены в 22–29 группах [1]. Однако в настоящее время из-за появления в практической микробиологии новых методов идентификации микроорганизмов, их таксономия расширилась. Порядок *Actinomycetales* по новым данным

включает 14 подотрядов и более 45 семейств [2]. В медицинской практике наибольший интерес представляют семейства *Actinomycetaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Nocardiaceae*.

Представители родов *Gordonia* и *Nocardia* относятся к типу *Actinobacteria*, классу *Actinobacteria*, порядку *Actinomycetales*, подпорядку *Corynebacterineae*, семейству *Nocardia*. Но с учетом современных данных, полученных благодаря 16S рРНК секвенированию и хемотаксономическим маркерам, некоторые авторы выделяют представителей рода *Gordonia* в отдельное семейство *Gordoniaceae*, так как не было найдено общих белков для гордоний и нокардий, которые позволили бы отнести их к одному семейству [20, 23, 34, 54].

Нокардии были впервые выделены ветеринаром Эдмондом Нокардом в 1888 г. [25]. Через год В. Тревисан дал этому изоляту название *N. farcinica*, а в 1954 г. *N. farcinica* стала типовым видом для этого рода. Исследования R.E. Gordon и ее коллег в 1962 г. не показали фенотипических различий между *N. farcinica* и *N. asteroides*, и в дальнейшем *N. asteroides* стал типовым видом рода *Nocardia*. Важной проблемой в таксономии и номенклатуре нокардий являлся статус названия *N. asteroides*, так как многие из изолятов были неверно идентифицированы по современным данным. В 1988 г. Wallace в своих работах указывал на различную чувствительность к антимикробным химиопрепаратам *N. asteroides*. Это привело к разделению этого изолята на 6 групп. В настоящее время, благодаря 16S рРНК секвенированию, название *N. asteroides* присвоено отдельной группе, а из выделенных 6 групп были образованы новые таксоны: *N. abscessus*, *N. brevicatena/N. paucivorans*, комплекс *N. nova*, комплекс *N. transvalensis*, *N. farcinica* и *N. cyriacigeorgica* [11, 13].

По данным современной классификации род *Nocardia* включает в себя свыше 80 видов, большинство из которых редко вызывают заболевания у людей. Однако это наиболее часто встречающаяся группа условно патогенных микроорганизмов среди аэробных актиномицет. Все представители рода грамположительны, морфологически представляют собой тонкие и длинные гифоподобные клетки, однако, в некоторых случаях могут давать не примыкающие друг к другу цепочки кокков. Также в мазках могут быть обнаружены ветвящиеся нити, которые формируются в результате разрушения мицелия нокардий. Все представители рода *Nocardia* имеют выраженную клеточную стенку, которая состоит из мезодиаминопимелиновой кислоты, арабинозы и галактозы [4, 11, 22, 23].

Многие представители рода *Nocardia* могут проявлять кислотоустойчивость, которая напрямую зависит от количества миколовых кис-

лот в клеточной стенке, не образуют капсулы и спор, неподвижны [7, 10, 26]. Характерной особенностью всех представителей рода *Nocardia* является соотношение гуанина и цитидина (Г+Ц) в ДНК примерно 68,1% [53]. По другим данным соотношение Г+Ц колеблется в пределах от 68,4 до 70,8% [14].

Культуральные свойства нокардий довольно разнообразны. Морфология колоний различна у каждого вида и часто варьирует в зависимости от штамма внутри вида. Для получения видимых колоний необходимо культивирование в течение минимум 48–72 ч [52].

Род *Gordonia* (ранее *Gordonia*) первоначально был выделен М. Tsukamura в 1971 г. [46]. В 1977 г. он был включен в род *Rhodococcus*, однако снова был выделен в отдельный род в 1988 г. [24, 43]. Представители рода *Gordonia* ранее часто неправильно идентифицировались в качестве других актиномицет или микобактерий, но использование 16S рРНК секвенирования позволило значительно улучшить идентификацию этих микроорганизмов [29].

Представители рода *Gordonia* являются грамположительными, каталазоположительными, слабокислотоустойчивыми, аэробными неспорообразующими нокардиоморфными микроорганизмами. Содержат в клеточной стенке миколовые кислоты длиной приблизительно от 46 до 66 атомов углерода, а также содержат менахинон из девяти изопреновых единиц. Соотношение Г+Ц у бактерий рода *Gordonia* в ДНК колеблется от 63 до 69% [5].

Культуральные свойства гордоний значительно отличаются от нокардий. Морфология колоний видов *Gordonia* может быть от слизистых, гладких и глянцевых, до шероховатых и грубых. Культуральные свойства могут отличаться в пределах одного вида в зависимости от среды, используемой для культивирования [32]. В настоящее время в роде *Gordonia* описаны 29 видов [29].

Эпидемиология и клиническое значение представителей родов *Gordonia* и *Nocardia*

Аэробные актиномицеты имеют широкое распространение в окружающей среде, некоторые авторы предполагают, что основным местом обитания актиномицет является почва и вода [38]. На данный момент не зафиксировано случаев передачи инфекции, вызванной нокардиями и гордониями непосредственно от пациента к пациенту.

Учитывая современные данные, можно сделать лишь предварительный вывод о географической распространенности заболеваний,

вызываемых представителями рода *Nocardia*. Однако следует учитывать, что некоторые виды распространены в районах с определенными климатическими условиями. Так, например, *N. brasiliensis* чаще встречается в тропическом и субтропическом климате [12, 35].

При участии в патологическом процессе нокардии в основном действуют как факультативные внутриклеточные паразиты в макрофагах, в которых они ингибируют слияние фагосом с лизосомами [6, 15]. Также имеются сведения о том, что нейтрофилы и моноциты, как правило, не способны элиминировать эти микроорганизмы [19].

Инфицирование чаще всего происходит через дыхательные пути при вдыхании фрагментов мицелия из окружающей среды [39]. Наиболее подвержены нокардиозам пациенты с медикаментозной иммуносупрессией и иммуносупрессией, не связанной с приемом лекарственных препаратов (хроническая алкогольная интоксикация, сахарный диабет, ВИЧ-инфекция) [33, 50].

Наиболее часто представители рода *Nocardia* вызывают поражения в бронхолегочной системе, однако возможно развитие патологии и других локализаций. Половина всех случаев легочного нокардиоза сопровождается патологическими процессами внелегочной локализации. Только около 20% пациентов имеют внелегочную форму заболевания, которая обычно возникает при распространении возбудителя гематогенно или другими путями, однако для них также характерно первичное легочное поражение (анамнестические данные очаговых поражений легких) [3]. Наиболее часто в таких случаях развивается нокардиоз, связанный с поражением ЦНС. У таких пациентов обычно регистрируют один или несколько абсцессов головного мозга [30]. В то же время менингиты не характерны для нокардиозов с локализацией в ЦНС [49]. Имеются сведения об этиологическом значении некоторых представителей рода *Nocardia* в развитии глазных инфекций [16]. В отличие от легочных и системных форм нокардиоза, которые в первую развиваются у иммунокомпromетированных пациентов, кожный нокардиоз обычно регистрируется у иммунокомпетентных пациентов. Хотя данное заболевание может быть вызвано любым видом рода *Nocardia*, но *N. brasiliensis* является видом, выделенным в большинстве случаев первичного кожного или подкожного нокардиоза (приблизительно 80%) [36, 45]. Несмотря на все вышесказанное, бактериемия, вызванная нокардиями, встречается относительно редко, однако в последнее время все чаще регистрируются катетер-ассоциированные инфекции, связанные с представителями рода *Nocardia* [4].

Возможно, инфекционные процессы, вызванные нокардиями встречаются намного чаще, однако следует отметить, что большинство изолятов идентифицируются неправильно из-за отсутствия оптимальных методов видовой и родового определения.

Такая же ситуация складывается с инфекционными поражениями, обусловленными представителями рода *Gordonia*. В настоящее время число микроорганизмов, имеющих потенциальное клиническое значение среди аэробных актиномицет возрастает, в связи с этим все чаще в научной литературе поднимается вопрос их роли в патологических процессах различной этиологии. Сообщений об инфекциях, связанных с бактериями из рода *Gordonia*, относительно мало, что возможно связано с тем, что большее количество микроорганизмов может быть не выделено из клинического материала или они могут быть ошибочно идентифицированы как микобактерии или нокардии.

Примером вышеописанных сложностей выделения и идентификации является результат исследования, в котором у пяти пациентов с катетер-ассоциированными инфекциями, вызванными различными видами рода *Gordonia*, возбудитель был правильно идентифицирован только в одном случае при использовании рутинных методов, остальные четыре штамма были идентифицированы с использованием 16S рРНК секвенирования, которое значительно ограничено для использования в обычных лабораторных условиях [9]. У трех из пяти пациентов была выделена и идентифицирована *G. terrae*, у одного — *G. bronchialis* и у одного — *G. otitidis*. Единственным микроорганизмом, который был идентифицирован без использования генетических методов, был штамм *G. bronchialis*, определенный по биохимическим свойствам.

Так же как и при нокардиозах, иммунодефициты различной этиологии играют первостепенную роль в развитии патологических процессов, связанных с гордониями. Однако дополнительным фактором риска может быть патологическое состояние, связанные с попаданием в организм человека инородных тел, колонизированных данными микроорганизмами [18].

В ряде публикаций отмечена роль представителей рода *Gordonia* в этиологии широкого спектра заболеваний. Так, установлена причастность *G. terrae* к развитию холецистита, гранулематозного поражения кожи, абсцесса века, гранулематозного мастита, мицетомы руки, абсцесса мозга и менингита [8, 21, 31, 48], *G. bronchialis* обнаруживается при рецидивирующих абсцессах молочных желез и других мягких тканей, при вентрикулита [47, 48], *G. polyisoprenivorans* — при эндокардитах [27], *G. otitidis* — при наружном отите

и бронхитах [9, 27], *G. sputi* — при эндокардите и медиастените [31], *G. araii* — при артритях [28]. Кроме того, все вышеперечисленные микроорганизмы могут вызвать бактериемию, связанную с использованием центрального венозного катетера [9, 31, 42, 47].

Методы выделения и идентификации

При диагностике нокардиозов и инфекций, вызванных гордониями, клиническим материалом, чаще всего являются промывные воды бронхов, мокрота, пунктаты абсцессов, содержимое раневых дренажей, биоптаты, кровь, а также ликвор. Наиболее подходящими средами для первичного посева являются кровяной агар, шоколадный агар, агар с сердечно-мозговым экстрактом, агар Сабуро с декстрозой и среда Левенштейна–Йенсена, которые поддерживают рост большинства аэробных актиномицет. Забуференный угольно-дрожжевой агар (BCYE) лучше всего подходит для первичного выделения прихотливых видов *Nocardia*. Практически все представители аэробных актиномицет могут также расти в жидких средах, при этом рост проявляется в виде плотных гранул, которые в дальнейшем могут быть использованы для пересева на плотные среды [40].

Следует учитывать, что видимый рост представителей родов *Nocardia* и *Gordonia* при культивировании на 5% кровяном агаре при температуре 37°C может появиться через 6 суток.

Из существующих на сегодня методов идентификации микроорганизмов для представителей родов *Nocardia* и *Gordonia* могут быть использованы микроскопирование (ориентировочное значение) и биохимическая идентификация, но благодаря этим методам максимальный определяемый таксон чаще всего — род. Некоторые авторы описывают возможности анализа состава клеточной стенки и клеточных мембран для определения рода [17, 44].

Современные методы позволяют идентифицировать возбудителей родов *Gordonia* и *Nocardia* до вида. Такими методами являются 16S рРНК секвенирование, ПЦР и MALDI-ToF масс-спектрометрия. Наиболее современным методом в микробиологических лабораториях на наш взгляд является масс-спектрометрия. Однако даже она проблемна для определения видов *Nocardia* и *Gordonia*. Для идентификации изоляты культивируют на колумбийском кровяном агаре с добавлением 5% овечьей крови и инкубируют 48 ч при 36°C. Далее производится анализ с помощью настольного масс-спектрометра. Образцы покрывают 1 мл 100% муравьиной кислоты и, после сушки, добавляется 1 мл альфа-циано-4-гидроксикоричная кислота (α-НССА) в соответствии с инструк-

циями производителя. Для точности изоляты анализируют нанесением на мишень 2 точек [37]. На сегодняшний день библиотеки масс-спектров содержат данные о 40 видах *Nocardia* и о 7 видах *Gordonia*.

Особенности антибиотикорезистентности

Согласно CLSI, процедуры определения чувствительности к противомикробным препаратам для нокардий и других анаэробных актиномицет проводят с помощью двойных серийных микроразведений в бульоне, и с использованием панели с разведениями антибиотиков, эффективных в отношении представителей данных родов. Для нокардий интерпретацию результатов проводят после 3–5-дневного инкубирования, но продолжительность культивирования может варьировать в зависимости от вида.

Антимикробные препараты, которые рекомендуются для первичного определения чувствительности аэробных актиномицет, включают амикацин, амоксициллин-клавуланат, цефтриаксон, цiproфлоксацин, кларитромицин, имипенем, линезолид, миноциклин, триметоприм-сульфаметоксазол и тобрамицин; для вторичного тестирования используют цефепим, цефотаксим и гентамицин. Штаммы *N. cyriacigeorgica*, как правило, чувствительны к амикацину, цефтриаксону, линезолиду, сульфаниламидам; резистентны к амоксициллин-клавуланату, цiproфлоксацину, кларитромицину. *N. farcinica* чувствительна к амикацину, амоксициллин-клавуланату, цiproфлоксацину, линезолиду и сульфаниламидам; резистентна к цефтриаксону, кларитромицину, тобрамицину. *N. nova* чувствительна к амикацину, цефтриаксону, кларитромицину, имипенему, линезолиду и сульфаниламидам; резистентна к амоксициллин-клавуланату и цiproфлоксацину. *N. brevicatena* чувствительна к амикацину, цефтриаксону, линезолиду, цiproфлоксацину; резистентна к кларитромицину, имипенему [51].

Оптимальная терапия нокардиозов до сих пор не разработана, однако имеются сведения об эффективности комбинации триметоприма-сульфаметоксазола [41]. Длительность терапии обычно определяют индивидуально, чтобы свести к минимуму риск рецидива заболевания. Иммунокомпетентные пациенты с легочным или мультифокальным (не ЦНС) нокардиозом могут лечиться в течение 2–12 месяцев. Иммуносупрессивные пациенты и пациенты с заболеванием ЦНС должны получать терапию не менее 12 месяцев с соответствующим мониторингом [36, 50].

По данным литературы, бактерии рода *Gordonia* демонстрируют высокую восприимчивость

ко многим противомикробным препаратам. При определении антибиотикорезистентности бактерий рода *Gordonia* была доказана эффективность ванкомицина (особенно в сочетании с цефалоспорином расширенного спектра, или с карбапенемом, или с рифампицином), линезолида, амоксициллина или амоксициллин-клавуланата (в виде ступенчатой терапии), триметоприм-сульфаметоксазола, цефтриаксона, цефтазидима, пиперациллин-тазобактама, тикарциллин-клавуланата, имипенем-циластатина, меропенема, цiproфлоксацина, левофлоксацина, амикацина или гентамицина (в комбинации с цефалоспорином или карбапенемом), азитромицина и клиндамицина. Продолжительность антибиотикотерапии варьирует от 6 до 12 недель [29]. Следует отметить отсутствие рекомендаций по определению чувствительности городоний к противомикробным препаратам и критериев интерпретации полученных результатов.

Заключение

Кислотоустойчивые представители порядка *Actinomycetales* все чаще становятся объектами научного и практического интереса среди специалистов различных специальностей. Увеличение количества пациентов из групп риска неизбежно влечет за собой значительное расширение этиологически значимой микрофлоры, которая требует от врачей-бактериологов и клиницистов разработки и внедрения в практику новых подходов к культивированию и идентификации «новых» микроорганизмов. Разработка методов культивирования и идентификации представителей родов *Nocardia* и *Gordonia* позволит получить необходимые данные о распространенности этих групп микроорганизмов среди пациентов из групп риска, оптимизировать схемы терапии инфекционных процессов, обусловленных нocardиями и городониями.

Список литературы/References

1. Определитель бактерий Берджи: в 2 т. Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Смита, Дж. Стейли, С. Уильямса. М.: Мир, 1997. 800 с. [Determinant of bacteria Burgi. In 2 vols. Eds. J. Holt, N. Krieg, P. Snit, J. Staley, S.S. Williams. Moscow: Mir, 1997. 800 p. (In Russ.)]
2. Actinomycetales — list of prokaryotic names with standing in nomenclature. Retrieved 2016-10-04
3. Aggarwal D., Garg K., Chander J., Saini V., Janmeja A.K. Pulmonary nocardiosis revisited: a case series. *Lung India*, 2015, vol. 32, no 2, pp. 165–168. doi: 10.4103/0970-2113.152638
4. Al Akhrass F., Hachem R., Mohamed J.A., Tarrand J., Kontoyiannis D.P., Chandra J., Ghannoum M., Haydoura S., Chaftari A.M., Raad I. Central venous catheter-associated *Nocardia* bacteremia in cancer patients. *Emerg. Infect. Dis.*, 2011, vol. 17, no. 9, pp. 1651–1658. doi: 10.3201/eid1709.101810
5. Arenskötter M., Bröker D., Steinbüchel A. Biology of the metabolically diverse genus *Gordonia*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, vol. 70, no. 6, pp. 3195–3204. doi: 10.1128/AEM.70.6.3195-3204.2004
6. Beaman B.L. Interaction of *Nocardia asteroides* at different phases of growth with in vitro-maintained macrophages obtained from lungs of normal and immunized rabbits. *Infect. Immun.*, 1979, vol. 26, pp. 355–361.
7. Bergey's Manual of determinative bacteriology; 9th ed. Ed. J.G. Holt. Baltimore, Williams & Wilkins, 1994.
8. Blanc V., Dalle M., Markarian A., Debunne M.V., Duplay E., Rodriguez-Nava V., Boiron P. *Gordonia terrae*: a difficult-to-diagnose emerging pathogen? *J. Clin. Microbiol.*, 2007, vol. 45, no. 3, pp. 1076–1077. doi: 10.1128/JCM.02394-06
9. Blaschke A.J., Bender J., Byington C.L., Korgenski K., Daly J., Petti C.A., Pavia A.T., Ampofo K. *Gordonia* species: emerging pathogens in pediatric patients that are identified by 16S ribosomal RNA gene sequencing. *Clin. Infect. Dis.*, 2007, vol. 45, pp. 483–486. doi: 10.1086/520018
10. Bridson E. The oxford vade-mecum of microbiology. UK, Unipath Ltd., Basingstoke, 1993. 219 p.
11. Brown-Elliott B.A., Brown J.M., Conville P.S., Wallace R.J. Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2006, vol. 19, no. 2, pp. 259–282. doi: 10.1128/CMR.19.2.259-282.2006I
12. Brown J.M., McNeil M.M. *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Actinomyces*, *Streptomyces*, and other aerobic actinomycetes. In: Manual of clinical microbiology, 8th ed. Eds. P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Tenover, R.H. Tenover. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 2003, pp. 502–531.
13. Conville P.S., Brown-Elliott B.A., Smith T., Zelazny A.M. The complexities of *Nocardia* taxonomy and identification. *J. Clin. Microbiol.*, 2017, vol. 56, no. 1, pp. 1417–1419. doi: 10.1128/JCM.01419-17
14. Cummins C.S. Chemical composition and antigenic structure of cell walls of *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Actinomyces* and *Arthrobacter*. *J. Gen. Microbiol.*, 1962, vol. 28, pp. 35–50. doi: 10.1099/00221287-28-1-35
15. Davis-Scibienski C., Beaman B.L. Interaction of *Nocardia asteroides* with rabbit alveolar macrophages: association of virulence, viability, ultrastructural damage and phagosome-lysosome fusion. *Infect. Immun.*, 1980, vol. 28, pp. 610–661.
16. DeCroos F.C., Garg P., Reddy A.K., Sharma A., Krishnaih S., Mungale M., Mruthyunjaya P. Optimizing diagnosis and management of *Nocardia* keratitis, scleritis, and endophthalmitis: 11-year microbial and clinical overview. *Ophthalmology*, 2011, vol. 118, pp. 1193–1200. doi: 10.1016/j.ophtha.2010.10.037
17. Fang B.Z., Han M.X., Zhang L.Y., Jiao J.Y., Zhang X.T., Zhang Z.T., Wang Y., Nie G.X., Li W.J. *Nocardia aurea* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from a karstic subterranean environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2018, vol. 69, no. 1, pp. 159–164. doi: 10.1099/ijsem.0.003122
18. Fang W., Li J., Cui H.S., Jin X., Zhai J., Dai Y., Li Y. First identification of *Gordonia sputi* in a post-traumatic endophthalmitis patient — a case report and literatures review. *BMC Ophthalmol.*, 2017, vol. 17, no. 1: 190. doi: 10.1186/s12886-017-0573-5

19. Filice G.A., Beaman B.L., Krick J.A., Remington J.S. Effect of human neutrophils and monocytes on *Nocardia asteroides*: failure of killing despite occurrence of the oxidative metabolic burst. *J. Infect. Dis.*, 1980, vol. 142, pp. 432–438.
20. Gao B., Gupta R. Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2012, vol. 76, pp. 66–112. doi: 10.1128/MMBR.05011-11
21. Gil-Sande E., Brun-Otero M., Campo-Cerecedo F., Esteban E., Aguilar L., García-de-Lomas J. Etiological misidentification by routine biochemical tests of bacteremia caused by *Gordonia terrae* infection in the course of an episode of acute cholecystitis. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, vol. 44, no. 7, pp. 2645–2647. doi: 10.1128/JCM.00444-06
22. Goodfellow M. Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 1971, vol. 69, no. 1, pp. 33–80. doi: 10.1099/00221287-69-1-33
23. Goodfellow M. Phylum XXVI. Actinobacteria phyl. nov. In: Bergey's manual of systematic bacteriology; 2nd ed. Eds. M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.-J. Busse, M.E. Trujillo, K.-I. Suzuki, W. Ludwig, W.B. Whitman. New York: Springer, 2012, pp. 33–2083.
24. Goodfellow M., Alderson G. The actinomycete-genus *Rhodococcus*: a home for the "rhodochrous" complex. *J. Gen. Microbiol.*, 1977, vol. 100, no. 1, pp. 99–122. doi: 10.1099/00221287-100-1-99
25. Goodfellow M., Maldonado L.A. Genus *Nocardia* Trevisan 1889. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. New York: Springer, 2012, pp. 376–419.
26. Goodfellow M., Pirouz T. Numerical classification of sporoactinomycetes containing meso-diaminopimelic acid in the cell wall. *J. Gen. Microbiol.*, 1982, vol. 128, no. 3, pp. 503–527. doi: 10.1099/00221287-128-3-503
27. Iida S., Taniguchi H., Kageyama A., Yazawa K., Chibana H., Murata S., Nomura F., Kroppenstedt R.M., Mikami Y. *Gordonia otitidis* sp. nov., isolated from a patient with external otitis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2005, vol. 55, no. 5, pp. 1871–1876. doi: 10.1099/ij.s.0.63282-0
28. Jannat-Khah D.P., Halsey E.S., Lasker B.A., Steigerwalt A.G., Hinrikson H.P., Brown J.M. *Gordonia araii* infection associated with an orthopedic device and review of the literature on medical device-associated *Gordonia* infections. *J. Clin. Microbiol.*, 2009, vol. 47, no. 2, pp. 499–502. doi: 10.1128/JCM.01504-08
29. Johnson J.A., Onderdonk A.B., Cosimi L.A., Yawetz S., Lasker B.A., Bolcen S.J., Marty F.M. *Gordonia* bronchialis Bacteremia and pleural Infection: case report and review of the literature. *J. Clin. Microbiol.*, 2011, vol. 49, no. 4, pp. 1662–1666. doi: 10.1128/JCM.02121-10
30. Kirmani N., Tuazon C.U., Ocuin J.A., Thompson A.M., Kramer N.C., Geelhoed G.W. Extensive cerebral nocardiosis cured with antibiotic therapy alone. Case report. *J. Neurosurg.*, 1978, vol. 49, no. 6, pp. 924–928. doi: 10.3171/jns.1978.49.6.0924
31. Lesens O., Hansmann Y., Riegel P., Heller R., Benaissa-Djellouli M., Martinot M., Petit H., Christmann D. Bacteremia and endocarditis caused by a *Gordonia* species in a patient with a central venous catheter. *Emerg. Infect. Dis.*, 2000, vol. 6, no. 4, pp. 382–385. doi: 10.3201/eid0604.000410
32. Linos A., Berekaa M.M., Steinbüchel A., Kim K.K., Sproer C., Kroppenstedt R.M. *Gordonia westfalica* sp. nov., a novel rubber-degrading actinomycete. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2002, vol. 52, no. 4, pp. 1133–1139. doi: 10.1099/00207713-52-4-1133
33. Long P.F. A retrospective study of *Nocardia* infections associated with the acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Infection*, 1994, vol. 2, pp. 362–364. doi: 10.1007/bf01715551
34. Ludwig W., Euzéby J., Schumann P., Buss H.J., Trujillo M.E., Kämpfer P., Whitman W.B. Road map of the phylum Actinobacteria. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2012, vol. 5, pp. 1–28. doi: 10.1007/978-0-387-68233-4
35. Manual of clinical microbiology. Eds: Murray P.R., Baron E.J., Tenover J.C., Tenover F.C. Washington, DC: ASM Press, 2003. 2310 p.
36. Maraki S., Chochlidakis S., Nioti E., Tselentis Y. Primary lymphocutaneous nocardiosis in an immunocompetent patient. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2004, vol. 3: 24. doi: 10.1186/1476-0711-3-24
37. Marín M., Ruiz A., Iglesias C., Quiroga L., Cercenado E., Martín-Rabadán P., Bouza E, Rodríguez-Sánchez B. Identification of *Nocardia* species from clinical isolates using MALDI-Tof mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2018, vol. 24(12), pp. 1342.e5–1342.e8. doi: 10.1016/j.cmi.2018.06.014
38. McNeil M.M., Brown J.M. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1994, vol. 7, no. 3, pp. 357–417.
39. Saubolle M.A., Sussland D. Nocardiosis review of clinical and laboratory experience. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, vol. 41, no. 10, pp. 4497–4501. doi: 10.1128/JCM.01419-17
40. Simner P.J., Doerr K.A., Steinmetz L.K., Wengenack N.L. Mycobacterium and aerobic actinomycete culture: are two medium types and extended incubation times necessary? *J. Clin. Microbiol.*, 2016, vol. 54, no. 4, pp. 1089–1093. doi: 10.1128/JCM.02838-15
41. Smego R.A. Jr, Moeller M.B., Gallis H.A. Trimethoprim-sulfamethoxazole therapy for *Nocardia* infections. *Arch. Intern. Med.*, 1983, vol. 143, no. 4, pp. 711–718.
42. Sng L.H., Koh T.H., Toney S.R., Floyd M., Butler W.R., Tan B.H. Bacteremia caused by *Gordonia bronchialis* in a patient with sequestrated lung. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, vol. 42, no. 6, pp. 2870–2871. doi: 10.1128/JCM.42.6.2870-2871.2004
43. Stackebrandt E., Smida J., Collins M.D. Evidence of phylogenetic heterogeneity within the genus *Rhodococcus*: revival of the genus *Gordonia* (Tsukamura). *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 1988, vol. 34, pp. 341–348. doi: 10.2323/jgam.34.341
44. Staneck J.L., Roberts G.D. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl. Microbiol.*, 1974, vol. 28, no. 2, pp. 226–231.
45. Steinbrink J., Leavens J., Kauffman C.A., Miceli M.H. Manifestations and outcomes of nocardia infections: Comparison of immunocompromised and nonimmunocompromised adult patients. *Medicine*, 2018, vol. 97, no. 40: e12436. doi: 10.1097/MD.00000000000012436
46. Tsukamura M. Proposal of a new genus, *Gordonia*, for slightly acid-fast organisms occurring in sputa of patients with pulmonary disease and in soil. *J. Gen. Microbiol.*, 1971, vol. 68, no. 1, pp. 15–26. doi: 10.1099/00221287-68-1-15
47. Verma P., Brown J.M., Nunez V.H., Morey R.E., Steigerwalt A.G., Pellegrini G.J., Kessler H.A. Native valve endocarditis due to *Gordonia polyisoprenivorans*: case report and review of literature of bloodstream infections caused by *Gordonia* species. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, vol. 44, no. 5, pp. 1905–1908. doi: 10.1128/JCM.44.5.1905-1908.2006

48. Werno A.M., Anderson T.P., Chambers S.T., Laird H.M., Murdoch D.R. Recurrent breast abscess caused by *Gordonia bronchialis* in an immunocompetent patient. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, vol. 43, no. 6, pp. 3009–3010. doi: 10.1128/JCM.43.6.3009-3010.2005
49. Willis M.S., Cavuoti D., Gander R. *Nocardia meningitis*. *Lab. Med.*, 2001, vol. 32, no. 11, pp. 695–699.
50. Wilson J.W. Nocardiosis: updates and clinical overview. *Mayo. Clin. Proc.*, 2012, vol. 87, no. 4, pp. 403–407. doi: 10.1016/j.mayocp.2011.11.016
51. Woods G.L. Susceptibility testing for mycobacteria. *Clin. Infect. Dis.*, 2000, vol. 31, no. 5, pp. 1209–1215. doi: 10.1086/317441
52. Yamamoto F., Yamashita S., Kawano H., Tanigawa T., Mihara Y., Gonoi T., Ando Y. Meningitis and ventriculitis due to *Nocardia araoensis* Infection. *Intern. Med.*, 2017, vol. 56, no. 7, pp. 853–859. doi: 10.2169/internalmedicine.56.7332
53. Yasuike M., Nishiki I., Iwasaki Y., Nakamura Y., Fujiwara A., Shimahara Y., Kamaishi T., Yoshida T., Nagai S., Kobayashi T., Katoh M. Analysis of the complete genome sequence of *Nocardia seriolae* UTF1, the causative agent of fish nocardiosis: The first reference genome sequence of the fish pathogenic *Nocardia* species. *PLoS One*, 2017, vol. 1, no. 3: e0173198. doi: 10.1371/journal.pone.0173198
54. Zhi X.Y., Li W.J., Stackebrandt E. An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2009, vol. 59, pp. 589–608. doi: 10.1099/ijss.0.65780-0

Авторы:

Лямин А.В., к.м.н., доцент кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБУ ВО Самарский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Самара, Россия;

Жестков А.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБУ ВО Самарский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Самара, Россия;

Никитина Т.Р., к.м.н., доцент кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Самара, Россия;

Подсевалов В.С., студент лечебного факультета ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Самара, Россия;

Трофимов А.Р., студент лечебного факультета ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Самара, Россия;

Исмагуллин Д.Д., ординатор кафедры фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой ФГБУ ВО Самарский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Самара, Россия.

Authors:

Lyamin A.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of General and Clinical Microbiology, Immunology and Allergology, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation;

Zhestkov A.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of General and Clinical Microbiology, Immunology and Allergology, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation;

Nikitina T.R., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of General and Clinical Microbiology, Immunology and Allergology, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation;

Podsevalov V.S., Student, Faculty of General Medicine, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation;

Trofimov A.R., Student, Faculty of General Medicine, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation;

Ismatullin D.D., Resident Physician, Department of Fundamental and Clinical Biochemistry With Laboratory Diagnostics, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation.

АДГЕЗИНЫ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

А.А. Бывалов, И.В. Коньшев

Институт физиологии Коми научного центра УрО РАН, Вятский государственный университет, г. Киров, Россия

Резюме. В составе клеток *Yersinia pseudotuberculosis* идентифицировано порядка 15 поверхностных компонентов, которые можно отнести к числу бактериальных адгезинов. Это устанавливалось с помощью сочетания, в первую очередь, микробиологических, молекулярно-генетических, иммунохимических, биофизических методов исследования. Адгезины *Y. pseudotuberculosis* различаются по структуре и химическому составу, но преимущественно это белковые молекулы. Они могут обеспечивать адгезию бактерий к телу эукариотической клетки либо непосредственно либо через компоненты внеклеточного матрикса. Для ряда из них установлено участие в выполнении не только адгезивных, но и иных физиологических функций возбудителя в системе «паразит–хозяин». Биосинтез вышеуказанных адгезинов кодируется хромосомной ДНК; исключение составляет белок YadA, кодируемый плазмидой кальцийзависимости rYV, общей для патогенных иерсиний. Оптимальная температура для биосинтеза адгезинов — температура тела теплокровных, лишь инвазин InvA, полноценная, «гладкая» форма липополисахарида (ЛПС) и OmpF продуцируются *Y. pseudotuberculosis* при более низких температурах. Несколько адгезинов (Psa, InvA) могут экспрессироваться при кислых значениях pH, соответствующих внутриклеточному содержанию, — патогенные иерсинии являются факультативными внутриклеточными паразитами. Три патогенных для человека вида иерсиний различаются между собой по способности к продукции тех или иных адгезинов. Адгезия бактерий *Y. pseudotuberculosis* к клеткам или внеклеточным компонентам ткани хозяина на различных стадиях инфекционного процесса определяется совокупным действием нескольких адгезинов, перечень которых зависит от химического состава и физико-химических свойств окружающей микроб среды. Предполагается, что на начальном этапе инфекционного процесса адгезивность *Y. pseudotuberculosis*, являющегося энтеропатогеном, к клеткам слизистой кишечника определяется преимущественно белком InvA и «холодовым» вариантом ЛПС. Именно эти адгезины продуцируются клетками возбудителя при пониженной (менее 30°C) температуре, характерной для внешней среды, откуда они поступают в организм человека. На последующих стадиях патогенеза, после преодоления эпителиального барьера тонкого кишечника, бактерии начинают экспрессировать иные адгезины, способствующие выживанию и распространению возбудителя в организме хозяина, в первую очередь диссеминации в мезентериальные лимфатические узлы и, возможно, в печень и селезенку. При этом качественный и количественный спектр адгезинов, продуцируемых бактериями *Y. pseudotuberculosis*, определяется свойствами окружающей микроб среды макроорганизма (межклеточное пространство, внутриклеточное содержимое тех или иных эукариотических клеток).

Ключевые слова: *Yersinia pseudotuberculosis*, адгезины, рецептор, эукариотическая клетка.

YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS-DERIVED ADHESINS

Byvalov A.A., Konyshov I.V.

Institute of Physiology of the Komi Science Center, Ural Branch of the RAS, Vyatka State University, Kirov, Russian Federation

Abstract. Around fifteen surface components referred to adhesins have been identified in *Yersinia pseudotuberculosis* combining primarily microbiological, molecular and genetic, as well as immunochemical and biophysical methods. *Y. pseudotuberculosis*-derived adhesins vary in structure and chemical composition but they are mainly presented by protein mol-

Адрес для переписки:

Бывалов Андрей Анатольевич
610000, г. Киров, ул. Московская, 36, каб. 513а,
Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН.
Тел.: 8 912 701-32-56 (моб.).
E-mail: byvalov@nextmail.ru

Contacts:

Andrey A. Byvalov
610000, Russian Federation, Kirov, Moskovskaya str., 36, off. 513a,
Institute of Physiology of the Komi Science Center of the Ural Branch
of the RAS.
Phone: +7 912 701-32-56 (mobile).
E-mail: byvalov@nextmail.ru

Библиографическое описание:

Бывалов А.А., Коньшев И.В. Адгезины *Yersinia pseudotuberculosis* // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 3–4. С. 437–448. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-437-448

Citation:

Byvalov A.A., Konyshov I.V. *Yersinia pseudotuberculosis*-derived adhesins // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 3–4, pp. 437–448. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-437-448

ecules. Some of them were shown to participate not only in adhesive but in other pathogen-related physiological functions in the host-parasite interplay. Adhesins can mediate bacterial adhesion to eukaryotic cell either directly or via the extracellular matrix components. These adhesion molecules are encoded by chromosomal DNA excepting YadA protein which gene is located in the calcium-dependence plasmid pYV common for pathogenic yersinia. An optimum temperature for adhesin biosynthesis is located close to the body temperature of warm-blooded animals; however, at low temperature only invasin InvA, full-length smooth lipopolysaccharide and porin OmpF are produced in *Y. pseudotuberculosis*. Several adhesins (Psa, InvA) can be expressed at low pH (corresponds to intracellular content), thereby defining pathogenic yersinia as facultative intracellular parasites. Three human *Yersinia* genus pathogens differ by ability to produce adhesins. *Y. pseudotuberculosis* adherence to host cells or extracellular matrix components is determined by a cumulative adhesion-based activity, which expression depends on chemical composition and physicochemical environmental conditions. It's proposed that at the initial stage of infectious process adherence of *Y. pseudotuberculosis* to intestinal epithelium is mediated by InvA protein and "smooth" LPS form. These adhesins are produced in bacterial cells at low (lower than 30°C) temperature occurring in environment from which a pathogen invades into the host. At later stages of pathogenesis, after penetrating through intestinal epithelium, bacterial cells produce other adhesins, which promote survival and dissemination primarily into the mesenteric lymph nodes and, possibly, liver and spleen. At later stages of pathogenesis, after penetrating through intestinal epithelium, bacterial cells produce other adhesins, which promote survival and dissemination primarily into the mesenteric lymph nodes and, perhaps, liver and spleen. Qualitative and quantitative spectrum of *Y. pseudotuberculosis* adhesins is determined by environmental parameters (intercellular space, intracellular content within the diverse eukaryotic cells).

Key words: *Yersinia pseudotuberculosis*, adhesins, receptor, eukaryotic cell.

Род *Yersinia* к настоящему времени включает по меньшей мере 18 видов, три из которых являются патогенными для человека [23]. Один из них, *Y. pestis*, вызывает чуму — тяжелейшее системное заболевание, за последние три пандемии в современной истории человечества унесшее жизни более 200 млн человек. Два других, *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, являются возбудителями менее опасных гастроинтестинальных заболеваний. Основными входными воротами для чумного микроба являются кожа при бубонной форме заболевания, вызываемой укусом инфицированной блохи, и слизистая дыхательных путей при первично легочной чуме. Заражение людей энтеропатогенными иерсиниями происходит главным образом алиментарным путем.

Общие представления об адгезивности бактерий

Первый обязательный шаг, определяющий начало инфекционного процесса, состоит в непосредственном прямом контакте бактерий с эукариотической клеткой. В адгезии бактериальных клеток к поверхности субстрата могут участвовать такие физико-химические силы как взаимодействия Ван дер Ваальса, электростатические, гидрофобные, стерические, водородные связи [10, 64]. Основными свойствами соприкасающихся поверхностей, определяющими саму возможность или силу адгезии, являются их заряд и гидрофобность, причем бактерии с большей гидрофобностью лучше колонизируют гидрофобные материалы [10]. При приближении бактерии к субстрату

между ними начинают действовать разнонаправленные силы притяжения и отталкивания. Превалирование первых над вторыми приводит к адгезии [56]. В целом заряд клеток, как про-, так и эукариотических, отрицателен, однако неравномерность химического состава, а значит и физико-химических свойств соприкасающихся поверхностей определяет различный исход их взаимодействия — от взаимного отталкивания до необратимой адгезии.

Процесс адгезии микробной клетки к клетке эукариотической принято считать двухстадийным (как и в случае адгезии бактерий к неклеточным биотическим и абиотическим поверхностям [10]). На первой стадии происходит неспецифическое и обратимое связывание участков двух мембранных поверхностей, определяемое главным образом гидрофобным взаимодействием [17, 61]. Далее возможна реализация второго этапа взаимодействия — необратимого связывания; со стороны микробной клетки за это ответственны адгезины, со стороны эукариотической клетки — специфические или неспецифические рецепторные структуры или внеклеточные компоненты. От результатов такого межклеточного двухэтапного взаимодействия «паразит–хозяин» во многом зависит развитие и исход инфекционного процесса. Именно на предотвращении первичных стадий указанного взаимодействия — адгезии бактерий к клеткам хозяина — основан разрабатываемый с недавнего времени антиадгезионный подход к профилактике и лечению бактериальных инфекций [16, 61].

Значимость бактериальных адгезинов, как правило, не ограничивается способностью микробов к адгезии к эукариотическим клеткам.

Оснащенность бактерии адгезинами связывают с проявлением таких патогенных свойств, как инвазия, персистенция, выживание в клетках хозяина, биопленкообразование, цитотоксичность, информационный обмен [50]. Разнообразны также структура и химический состав бактериальных адгезинов. Адгезины могут иметь белковую, полисахаридную, липидную и смешанную природу. Они могут быть инкорпорированы в клеточную стенку, выступать за ее пределы в виде пилей, флагелл и др. Связывание адгезинов бактерий может осуществляться непосредственно с мембраной эукариотической клетки либо через компоненты внеклеточного матрикса. Ряд бактериальных адгезинов структурно схож, но характеризуется различной специфичностью. Некоторые бактерии экспрессируют структурно и химически различающиеся адгезины, которые вместе участвуют в процессе адгезии. Идентифицированы рецепторы, имеющие на своей молекуле более одного сайта связывания, которые комплементарны двум и более адгезинам [50, 54].

На основании структурно-функциональных свойств бактериальных адгезинов их подразделяют на несколько классов: адгезины-ауто-транспортеры, фимбриальные адгезины, белки семейства OmpX, омптин-подобные белки и др. [12, 63]. К настоящему времени установлено, что патогенные иерсинии, в том числе и *Y. pseudotuberculosis*, при различных условиях культивирования способны продуцировать многие адгезины из названных групп [12, 39].

Белковые адгезины-ауто-транспортеры

История изучения адгезинов иерсиний насчитывает более пяти десятилетий. Большинство идентифицированных белков патогенных иерсиний, в том числе и *Y. pseudotuberculosis*, одна из функций которых доказанно или предположительно связана с адгезивностью микроба к структурным компонентам хозяина, относятся к так называемым ауто-транспортерам или системе секреции пятого типа. Эти белки включают трансмембранный (транспортный, хелперный или β -домен) и транслоцируемый (внеклеточный, α -домен или passenger-домен) участки молекулы. Выделяют пять классов ауто-транспортеров — от Va до Ve [38]. Из их числа бактерии трех патогенных для человека видов *Yersinia* могут экспрессировать ауто-транспортеры типов Va, Vc и Ve [12].

Одним из первых идентифицированных и хорошо охарактеризованных адгезинов наружной мембраны *Y. pseudotuberculosis* (равно как и *Y. enterocolitica*, но не *Y. pestis*) является белок YadA, относящийся к адгезинам типа Vc [45]. Он опосредует адгезию бактерий не только

к эпителиальным клеткам, но и к макрофагам и нейтрофилам [19] путем связывания с такими компонентами внеклеточного матрикса, как коллагены четырех типов, ламинин и, с относительно большей аффинностью, фибронектин [27]. Размер этого адгезина относительно вариабелен, он может включать от 422 до 455 остатков [19]. Биосинтез YadA максимален при температуре 37°C и выше. При благоприятных условиях культивирования поверхность микробной клетки может быть покрыта этим белком практически полностью [28].

YadA — многофункциональный белок наружной мембраны, кодируемый плазмидой кальцийзависимости. Помимо прямого участия в адгезивности бактерий он задействован в аутоагглютинации, инвазии, устойчивости к фагоцитозу, бактерицидному действию сыворотки [39, 45]. YadA, действуя как адгезин, дает возможность бактерии *Y. enterocolitica* прикрепляться к эукариотической клетке и обеспечивать доставку в нее эффекторных белков аппарата системы секреции 3 типа [68]. В отличие от *Y. enterocolitica*, способность к продукции этого белка не влияет на вирулентность *Yersinia pseudotuberculosis* [19].

К числу тримерных адгезинов-ауто-транспортеров типа Vc, помимо YadA, относятся кодируемые хромосомой YadB и YadC, они экспрессируются клетками *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis*. Данные о способности клеток *Y. enterocolitica* к продукции этих белков противоречивы [22, 43]. С использованием мутантов по обоим белкам была показана их роль в инвазии эпителиальных клеток (HeLa) и невысокая значимость в адгезии к таким клеткам [22]. Если участие YadB и YadC в вирулентности *Y. pestis* показано [22], то их роль в патогенезе псевдотуберкулеза практически не изучена.

В группу ауто-транспортеров Ve-типа энтеропатогенных иерсиний входят 5 адгезинов — InvA–InvE. Инвазины *Y. pseudotuberculosis* могут экспрессироваться при различных условиях и на разных стадиях инфекционного процесса, обуславливая взаимодействие бактерии с разнообразными субстратами организма хозяина.

Типичная структура инвазинов представлена N-терминальным доменом, ответственным за их связывание с наружной мембраной, с повторяющимися иммуноглобулиноподобными доменами, состав которых довольно вариабелен у различных инвазинов, и C-терминальным доменом (доменом адгезии), отвечающим за специфичность связывания белка с целевыми молекулами хозяина. Несмотря на сходство инвазинов-ауто-транспортеров в общей структуре, они могут существенно различаться по первичной аминокислотной последовательности и выполняемым функциям [59].

Первичная последовательность и структура инвазина InvA, основного фактора адгезии *Y. pseudotuberculosis* на начальных стадиях инфицирования, очень близки таковым интиминам — белков наружной мембраны энтеропатогенных штаммов *E. coli*. Этот адгезин включает пять внеклеточных доменов, два наружных домена формируют интегрин-связывающий модуль [66]. Isberg R.R. и Leong J.M. [32] впервые показали, что рецепторы адгезии эукариотических клеток, связывающие белок инвазин *Y. pseudotuberculosis*, принадлежат к семейству интегринов. После попадания энтеропатогенных иерсиний в желудочно-кишечный тракт инвазин инициирует интернализацию бактерий, главным образом, в М-клетки Пейеровых бляшек тонкого кишечника путем связывания с их $\beta 1$ -интегринами [14]. Это, в свою очередь, инициирует продукцию таких провоспалительных цитокинов, как интерлейкин-8 (IL-8), моноцитарный хемотаксический протеин-1, фактор некроза опухоли (TNF α), колониестимулирующий фактор гранулоцитарных макрофагов и др. [49].

InvB (или Ifp — Intimin family protein) — недавно идентифицированный адгезин, способный связываться *in vitro* непосредственно с эпителиальными клетками человека Her-2. Предполагается, что, в отличие от InvA, Ifp экспрессируется в поздней лог-фазе при 37°C, является адгезином поздней стадии инфицирования [65]. Показана значимость InvB в вирулентности *Y. pseudotuberculosis*: инфицирование животных бактериями Ifp-дефицитного штамма, по сравнению с диким штаммом, приводило к значительному снижению колонизации Пейеровых бляшек, мезентериальных лимфатических узлов, печени и селезенки мыши [53].

InvC — белок *Y. pseudotuberculosis*, имеющий, как и InvB, высокую степень гомологии с семейством инвазин/интимин-подобных белков наружной мембраны. В отличие от InvA, InvC не продуцируется клетками *Y. pseudotuberculosis* в условиях *in vitro*. InvC синтезируется на относительно поздних стадиях инфицирования в клетках Пейеровых бляшек. Экспрессия InvC, равно как и InvB, в организме теплокровного хозяина приводит к тесной адгезии бактерий к кишечинальным клеткам человека, свиньи, мыши. Отсутствие белка InvC приводит лишь к незначительному снижению количества invC-мутантов в Пейеровых бляшках, но выраженной активизации в них профессиональных макрофагов, в первую очередь, нейтрофилов [53].

К семейству адгезинов-аутоотранспортеров Ve-типа *Y. pseudotuberculosis* относят белок InvD, значимая продукция которого начинается спустя 2–4 дня после инфицирования макроорга-

низма. Мишенью для этого белка служат Fab-фрагменты IgA/IgG-антител, а также иммуноглобулиновые сегменты рецептора малочисленной популяции В-клеток. Предположительно функции этого белка заключаются в нейтрализации IgA (наиболее многочисленного класса антител в просвете кишечника), играющего важную роль в предотвращении доступа патогенных бактерий к мукозальному барьеру и, далее, колонизации и инвазии. InvD функционально и структурно относят к так называемым «иммуноглобулиновым суперантигенам», результатом связывания которых с Fab-фрагментами антител или рецептором В-клеток могут быть пролиферация В-клеток, активация с последующей индукцией В-клеточного апоптоза, активация системы комплемента, стимуляция высвобождения цитокинов. Вторую группу иммуноглобулинсвязывающих бактериальных белков составляют белки, взаимодействующие с Fc-областью антител или Fc-рецепторами макрофагов, что препятствует распознаванию патогена иммунной системой, повышает устойчивость к действию комплемента [58].

Пятый из числа идентифицированных на данное время адгезинов-аутоотранспортеров Ve-типа — инвазин E (InvE). Этот белок структурно охарактеризован. Аминокислотная последовательность его С-концевого домена адгезии значительно отличается от таковой у других адгезинов-аутоотранспортеров, поэтому структура рецептора для InvE отличается от таковых для InvA *Y. pseudotuberculosis* и интимина *E. coli* и к настоящему времени не идентифицирована. Не выявлена также функциональная значимость этого адгезина для возбудителя псевдотуберкулеза [59].

К секретлируемым белкам патогенных иерсиний типа Va относят классические аутоотранспортеры (Yap), состоящие из N-терминального сигнального пептида, опосредующего транспорт белка в периплазматическое пространство, внеклеточного passenger-домена и С-терминального трансмембранного домена, формирующего транспортный канал, через который passenger секретируется через наружную мембрану [12]. Из числа предположительно или доказанно идентифицированных Va-аутоотранспортеров патогенных иерсиний лишь для нескольких удалось выявить их некоторые физиологические свойства. Так, белок YapC *Y. pestis*, экспрессируемый бактериями непатогенного штамма *E. coli* AAEC185, участвует в адгезии к эпителиальным клеткам человека Her-2 и мышинным макрофагоподобным клеткам RAW264.7, а также в аутоагглютинации и образовании биопленки [20]. В геноме бактерий *Y. pestis* выявлен ген *yapE*, единственный из чис-

ла генов ауто транспортеров типа Va, общий для всех трех патогенных иерсиний. Показано, что инактивация гена *yapE* в составе бактерий *Y. pestis* ведет к снижению уровня колонизации тканей хозяина; YapE участвует в адгезии бактерий к клеткам линии A549 легких человека, но не Herp-2 [37].

Сравнение геномов нескольких штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* показало наличие в них гена *yapV*, а также паралогичных генов (или псевдогенов) *yapK*, *yapJ*, *yapX* (последний либо отсутствует в клетках *Y. pestis* либо присутствует в них в виде псевдогена), соответствующих генам классических ауто транспортеров Va-типа. Клетки рекомбинантных вариантов *E. coli*, несущие гены *yapV* и *yapK*, опосредуют адгезию бактерий к альвеолярным эпителиальным клеткам человека линии A549, в отличие от реципиентного варианта, несущего только векторную плазмиду. Кроме того, рекомбинантные штаммы *E. coli*, экспрессирующие белки YapV, YapK, YapJ, равно как и сами эти белки, показали выраженную адгезивность к таким иммобилизованным белкам внеклеточного матрикса, как коллаген нескольких типов, ламинин, фибронектин [46]. Несмотря на наличие в клетках *Y. pseudotuberculosis* генов ряда ауто транспортеров Va-типа, их значимость в физиологии этого возбудителя, в отличие от *Y. pestis*, практически не исследована.

Белковые фимбриальные адгезины

Выделена группа так называемых фимбриальных адгезинов патогенных иерсиний, которая подразделяется на две подгруппы: фимбрии, формирующиеся с помощью механизма «*chaperone-usher*», и пили 4-го типа [12]. К первой подгруппе принадлежит антиген рН 6 (или Psa), идентифицированный в культурах всех трех патогенных для человека видов иерсиний. Этот белок представляет собой поверхностный гомополимер, состоящий из субъединиц (15 kDa) [7]. Благоприятные условия для биосинтеза Psa — рН = 5,0–6,7 и температура 35–41°C [8]. Выявлены две основные рецепторные структуры для Psa — галактозные остатки гликофинголипидов [51] и фосфатидилхолин на поверхности эукариотических клеток [24]. Psa является существенным фактором патогенности для *Y. pestis*, определяя устойчивость микроба к фагоцитозу макрофагами [30], адгезию к альвеолярным клеткам легких хозяина [48]. Этот белок участвует в термоиндуцибельной адгезии *Y. pseudotuberculosis* к эпителиальным клеткам человека Herp-2 и гемагглютинации [73].

Collyn F. и соавт. с использованием большого количества штаммов *Y. pseudotuberculosis* 1–6 серотипов в составе хромосомной ДНК более 40%

из них удалось идентифицировать локус, ответственный за биосинтез белка Pil, отнесенного к типу пилей IVB типа, способствующих адгезии бактерий к тканям хозяина. Авторы показали, что на транскрипцию этого оперона влияют такие факторы внешней среды, как температура, стадия роста, наличие кислорода, осмолярность. Передача оперона в клетки реципиентного штамма *E. coli* индуцировала способность бактерий формировать пучки филаментов на полюсе бактерии. Делеционная мутация в области данного кластера генов приводила к снижению вирулентности *Y. pseudotuberculosis* для орально инфицированных мышей, что указывает на значимость белка в патогенезе псевдотуберкулеза. Прямых данных об адгезивности белка Pil не обнаружено [15].

Иные белковые адгезины

Выделено также семейство OmpX-подобных белков-адгезинов, к которому относится кодируемый хромосомой белок Ail, общий для трех патогенных видов иерсиний. Несмотря на относительно малые размеры молекулы (17 kDa) и невысокий уровень экспрессии на поверхности бактерий, функции, выполняемые этим белком в клетках патогенных иерсиний, достаточно многочисленны и более широко изучены на примере бактерий *Y. enterocolitica*. Подобно Inv, Ail участвует в адгезии микроба к эпителиальным клеткам и их инвазии [44]. Наряду с YadA, белок Ail определяет устойчивость микроба к действию сыворотки [11]. В качестве молекул-мишеней для связывания Ail с внеклеточным матриксом служат ламинин, фибронектин и гепарансульфат-протеогликан [71]. Опосредуемое белком Ail, наряду с другими адгезинами иерсиний (Psa, Pla), связывание микроба с внеклеточным матриксом способствует доставке с помощью системы секреции 3 типа эффекторных белков в клетки хозяина. В зависимости от температуры культивирования бактерий вклад каждого из белков в адгезивность патогена меняется [21]. В лабораторных условиях биосинтез Ail *Y. enterocolitica* максимален при температуре 37°C на стационарной стадии роста культуры, но регистрируется и при более низкой температуре в логарифмической фазе роста. При этом устойчивость к действию сыворотки у культур, выращенных при 37°C, на четыре порядка превышает таковую 30-градусных культур [52].

Было показано, что в сопоставимых условиях адгезивная способность Ail *Y. pseudotuberculosis*, экспрессируемого в клетках реципиентного штамма *E. coli*, проявляется, но, в среднем, она оказалась на 40% ниже по сравнению с Ail *Y. pestis* в составе клеток аналогичного реком-

бинанта. Вместе с тем проявление адгезивности клетками *Y. pseudotuberculosis* с собственным белком Ail было малозначимым, что авторы объясняют влиянием молекул ЛПС, имеющих относительно большую длину [67].

В составе наружной мембраны *Y. pseudotuberculosis*, равно как и ряда других грамотрицательных бактерий, выявлены так называемые МАМ-белки (multivalent adhesion molecule), способные потенцировать инвазию микроба в отношении эпителиальных клеток и макрофагов хозяина [35, 41]. Один из них, конститутивно экспрессируемый при температуре 37°C белок МАМ7, участвует в первичном высоко-специфичном взаимодействии бактерии с эукариотическими клетками. Этот белок наружной мембраны с высокой аффинностью связывается с фибронектином и с меньшей — с фосфатидной кислотой мембраны хозяйской клетки. Авторы считают, что индуцируемая МАМ7 адгезия предшествует последующим стадиям взаимодействия, определяемого иными адгезинами, продукция которых усиливается по мере развития инфекции [35, 36].

С помощью метода оптической ловушки получены экспериментальные данные, свидетельствующие о способности порина OmpF, продуцируемого клетками *Y. pseudotuberculosis* при низкой температуре культивирования, связываться с мембраной макрофагов J774. Порин OmpC, экспрессируемый этими бактериями при температуре 37°C, указанным свойством не обладает [3].

Ранее считалось, что роль бактериальных флагелл ограничивается их участием в подвижности микробов. Однако результаты последующих исследований расширили представления о роли этих органелл в физиологии бактерий. Так, на примере ряда патогенов установлено участие флагелл в адгезии к тканям макроорганизма и модуляции иммунитета [57], инвазии в клетки хозяина [25], биопленкообразовании [33]. Значимость флагелл в качестве факторов адгезивности бактерий показана для таких возбудителей как *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* [57]. Как известно, псевдотуберкулезный микроб способен к образованию жгутиков в условиях пониженной температуры [5], однако их роль в адгезии возбудителя к эукариотическим клеткам пока не исследована, хотя и вполне вероятно.

Небелковые адгезины

Адгезия бактерий к биотическим и абиотическим субстратам определяется адгезинами не только белковой природы. Выявлены небелковые (карбогидратные) адгезины грамположи-

тельных бактерий — гликополимеры клеточной стенки (Cell wall glycopolymers — CWG) [60], секретруемые полисахариды группы (Polysaccharide intercellular adhesion — PIA) [47]. В обзоре [9] рассматриваются структура и функции адгезинов многих грамотрицательных бактерий белковой и углеводной природы. Уже давно предполагалось, что липоолигосахариды/липополисахариды наружной мембраны могут участвовать в адгезии грамотрицательных бактерий к клеткам макроорганизма нескольких типов, в том числе непрофессиональным фагоцитам, включая клетки слизистых [54].

Так, было показано, что коровая область ЛПС является лигандом *Y. pestis*, рецептором для которого, в частности, служит рецептор DC-SIGN или CD209 (DC-specific intercellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin receptor), экспрессируемый антигенпрезентирующими клетками. Взаимодействие этого рецептора, относящегося к семейству маннозных рецепторов [75], с кором ЛПС показано и для других грамотрицательных микробов [34, 74]. Было также установлено влияние на указанное взаимодействие «лиганд–рецептор» химического состава поверхностных структур бактерий. Так, клетки *Y. pestis* K1M, выращенные при температуре 6 либо 26, но не 37°C, инвазируют дендритные клетки человека, так как капсула, образованная F1-антигеном 37-градусных клеток, блокирует взаимодействие микроба с потенциальными рецепторами [74]. Аналогично, исходный шероховатый штамм *Y. pestis*, в отличие от его деривата, экспрессирующего O-боковые цепи *Y. enterocolinica*, способен инвазировать человеческие альвеолярные макрофаги и выживать в них [74]. Для ряда грамотрицательных бактерий, в том числе и *Y. pestis*, показано, что наличие O-боковых цепей липополисахарида (гомологичных или гетерологичных) блокирует взаимодействие возбудителя с дендритными клетками [34, 74, 75]. Вполне вероятно, что один из возможных универсальных механизмов антифагоцитарной активности некоторых грамотрицательных бактерий связан со способностью к экспрессии O-боковых цепей ЛПС, экранлирующих расположенный глубже лиганд [34].

Если роль CD209 в рецепции кора ЛПС *Y. pestis* установлена твердо, то участие этого рецептора во взаимодействии с клетками *Y. pseudotuberculosis* до настоящего времени экспериментально не подтверждено. Так, в параллельно проводившихся исследованиях было показано, что предварительное добавление в среду инкубации клеток HeLa, экспрессирующих CD209, гепарина, моноклональных антител к CD209, маннана, CD209-подобного белка мермаида, которые препятствуют взаимодействию бактерий с рецептором, не приводило к суще-

ственному изменению фагоцитарной активности клеток в отношении *Y. pseudotuberculosis*, но не *Y. pestis*. Кроме того, авторами не была выявлена разница между числом бактерий *Y. pseudotuberculosis*, фагоцитированных клетками HeLa, экспрессирующими и не экспрессирующими рецептор CD209 [74].

Антигенпрезентирующие клетки (дендритные, клетки Лангерганса и некоторые другие) могут нести, помимо DC-SIGN, иммунорецепторы еще по меньшей мере двух типов: DEC-205 (CD205) (этот рецептор мыши отвечает за взаимодействие с активатором плазмидогена *Y. pestis* [76]) и лангерин (CD207). CD207 клеток Лангерганса человека является рецептором наружной области олигосахарида кора *Y. pestis*. Это показано, в частности, путем блокирования взаимодействия бактерий *Y. pestis* с CD207-экспрессирующими клетками очищенными препаратами лангерина, антителами к CD207, препаратом олигосахарида кора. Лангерин-опосредованное связывание клеток Лангерганса с бактериями *Y. pestis* инициирует доставку последних к регионарным лимфатическим узлам, способствует инвазии, диссеминации возбудителя и развитию инфекционного процесса. Аналогичные исследования с бактериями *Y. pseudotuberculosis* Y1 серотипа O:1a, проводившиеся наряду с вариантами *Y. pestis* на основе штамма KIM10, показали практически полное отсутствие воздействия маннана, антител к CD207, очищенного лангерина на фагоцитоз возбудителя псевдотуберкулеза эукариотическими клетками, экспрессирующими Лангерин человека [72].

Оценивая вышеприведенные данные о взаимодействии бактерий *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* с рецепторами CD209 и CD207 клеток человека [72, 74], следует подчеркнуть, что в этих исследованиях авторы выращивали культуру *Y. pseudotuberculosis* только при температуре 26°C, способствующей продукции «холодового» варианта ЛПС. Вполне вероятно, что отсутствие влияния использованных блокаторов связи «лиганд–рецептор» на фагоцитирующую способность эукариотических клеток [72, 74] объясняется стерическим экранированием O-боковыми цепями коровой области липополисахарида *Y. pseudotuberculosis*; у бактерий *Y. pestis*, не экспрессирующих O-антиген, оцениваемое взаимодействие определяется именно кором ЛПС. Для обоснованного заключения об участии (неучастии) CD209 и CD207 в рецепции эукариотическими клетками бактерий *Y. pseudotuberculosis* в области кора ЛПС необходимо проведение дополнительных исследований, в частности, с использованием бактерий, выращенных и при температуре 37°C, при которой продукция O-боковых цепей ингибируется.

Вопрос о том, следует ли отнести липид А ЛПС к числу возможных адгезинов патогенных иерсиний, остается открытым. К настоящему времени для ряда бактерий установлена способность ЛПС в несвязанной с клеткой форме именно в области липида А взаимодействовать с рецепторами эукариотических клеток, как правило, через посредство ЛПС-связывающего белка с CD14 и далее с TLR4/MD2 [6], либо напрямую с TLR4/MD2. Показано, что R-форма ЛПС *E. coli*, лишенного O-боковых цепей, а также выделенный из него липид А намного эффективнее активируют клетки мыши, экспрессирующие сигнальный TLR4/MD2, по сравнению с S-формой ЛПС, не требуя для этого обязательного участия CD14 [31]. Несмотря на то что липид А является наиболее глубоко расположенным компонентом ЛПС, многие грамотрицательные бактерии могут взаимодействовать с объектами внешней среды путем прямого участия липида А. Так, показано, что химический состав липида А ЛПС (степень ацилирования) не только живых, но также и инактивированных формалином клеток *Salmonella enterica* серовар Турхимурium определяет уровень продукции провоспалительных цитокинов клетками U937 человека [42]. Более того, на основе моноклональных антител к липиду А разработана иммунохимическая тест-система, позволяющая с удовлетворительной чувствительностью (10^5 клеток/мл) выявлять бактерии *Escherichia coli* O157 [69]. Вместе с тем многочисленные исследования, направленные на разработку терапевтических средств на основе моноклональных антител к липиду А ряда грамотрицательных бактерий, к настоящему времени не завершились успешными клиническими испытаниями [26]. Будущие исследования должны показать, способны ли сами клетки патогенных иерсиний, а не только выделенный из них препарат ЛПС, связываться с эукариотической клеткой посредством липида А.

Применение иных методических подходов позволило подтвердить значимость ЛПС в адгезивности к эукариотическим клеткам бактерий *Y. pestis* и, кроме того, показать существенную роль ЛПС во взаимодействии с клетками хозяина бактерий *Y. pseudotuberculosis* [1, 2]. В этих исследованиях была использована модельная система, включающая полистироловые микросферы, сенсibilизированные препаратами ЛПС, и иммобилизованные на стекле макрофаги J774; методом силовой спектроскопии с использованием оптической ловушки оценивалась сила связи между сенсibilизированной микросферой и макрофагом. Полученные результаты позволили констатировать участие в связывании с мембраной макрофага коровой области ЛПС

Y. pestis вакцинного штамма EV. Было показано также, что определяемая ЛПС адгезивность *Y. pseudotuberculosis* опосредуется главным образом O-боковыми цепями, а не кором.

Адгезивность *Y. pseudotuberculosis* в патогенезе заболевания

Исходя из представленных выше опубликованных результатов исследований, схему начальных этапов инфекционного процесса, вызываемого *Y. pseudotuberculosis*, можно представить следующим образом. Заражение человека и животных псевдотуберкулезом происходит преимущественно оральным путем с контаминированными возбудителем пищей или водой либо, значительно реже, в результате прямого контакта с инфицированными животными и людьми [70]. Поступившая из внешней среды, температура которой, как правило, составляет (10–30)°С, культура возбудителя имеет фенотип, резко отличающийся от такового культуры, выращенной при температуре ~37°С — температуре тела теплокровных. Инкубация *Y. pseudotuberculosis* при такой пониженной температуре способствует экспрессии лишь небольшого числа адгезинов — компонентов наружной мембраны. Это, главным образом, инвазин InvA, продукция которого максимальна при температуре 25°С и слабощелочных значениях pH, а также «холодовой» тип ЛПС, характеризующийся, в частности, выраженной оснащённостью O-боковыми цепями [62]. Следует подчеркнуть способность энтеропатогенных иерсиний, равно как и ряда непатогенных для человека представителей рода *Yersinia*, к продукции высокополимерных O-боковых цепей [29] и, одновременно, к широким адаптивным возможностям персистенции во внешней среде. Длина O-боковых цепей у энтеробактерий может достигать 30–35 нм и более (длина одной субъединицы O-антигена составляет 1,0–1,3 нм); при этом показано, что с увеличением полимерности O-антигена в целом повышается адгезивность ЛПС к минеральному субстрату — нитриду кремния [64]. Указанные обстоятельства, а также высокая оснащённость поверхности бактерий молекулами ЛПС (он может покрывать до 75% поверхности микробной клетки [40]) позволяют предположить важную роль O-антигена ЛПС для выживания в природе, вполне вероятно, за счет его адгезивности к биотическим и абиотическим объектам внешней среды. После попадания инфекта в желудочно-кишечный тракт и преодоления содержимого желудка часть выживших микробов может адгезировать к эпителиальным клеткам тонкого

кишечника, главным образом, к M-клеткам Пейеровых бляшек [14]. Есть мнение, что адгезия иерсиний к M-клеткам происходит за счет взаимодействия с β 1-интегриновыми рецепторами не только инвазина InvA (напрямую), но и YadA (через фибронектин) [28]. Однако, значимость в указанном взаимодействии YadA (равно как и других адгезинов, продуцируемых при температуре тела теплокровных), если и есть, то, по-видимому, минимальна. Так, Mikula K.M. и соавт. считают, что этот адгезин экспрессируется после преодоления слизистой кишечника [43]. Вышеизложенное позволяет предположить, что в организм человека в естественных условиях *per os* могут попасть бактерии этого возбудителя, экспрессирующие в функционально значимом количестве только два адгезина — InvA и «холодовой» ЛПС. Роль порина OmpF, продуцируемого клетками *Y. pseudotuberculosis* при низких значениях температуры, в адгезии микроба к эукариотическим клеткам, предположительно, относительно мала, учитывая его меньшую удельную адгезивность в модельных экспериментах [3], а также существенно более низкое содержание в наружной мембране по сравнению с ЛПС. Ни малая продолжительность периода прохождения инфекта через верхние отделы пищеварительного тракта до своих входных ворот — эпителия тонкого кишечника, ни соответствующие неблагоприятные внешние условия на этом пути, по-видимому, не позволяют микробным клеткам не только пролиферировать, но и изменять свои поверхностные структуры до фенотипа 37-градусных, «тепловых» культур возбудителя, способных к продукции иных адгезинов. Вышеизложенное позволяет предположить, что из числа известных адгезинов *Y. pseudotuberculosis* InvA и ЛПС (преимущественно за счет O-боковых цепей) способствуют не только персистенции возбудителя во внешней среде, но также и адгезии к клеткам эпителия слизистой тонкого кишечника — входных ворот инфекции в организме теплокровного хозяина. Учитывая то, что с повышением температуры культивирования *Y. pseudotuberculosis* вирулентность бактерий для экспериментальных животных падает [4], а также принимая во внимание показанные адгезивные свойства InvA [14] и «холодового» варианта ЛПС [1], можно говорить о ключевой роли двух названных адгезинов на начальной стадии развития инфекционного процесса.

Интернализированные M-клетками Пейеровых бляшек бактерии в составе вакуоли транспортируются от апикальной к базолатеральной стороне, после чего попадают в подлежащее пространство, где презентуются клеткам иммунной системы — дендритным клеткам,

макрофагам, Т- и В-лимфоцитам [55] — с последующей возможной диссеминацией в мезентериальные лимфатические узлы и, с меньшей вероятностью, в селезенку и печень [18], и дальнейшим развитием процессов пато- и иммуногенеза. Адгезины псевдотуберкулезного микроба способствуют инъекции в клетки иммунной системы эффекторных белков, модулирующих сигнальные системы, которые индуцируют развитие неспецифического иммунного ответа, определяют устойчивость к фагоцитозу, комплемент-опосредованному лизису и др. [13, 43, 59]. В этих процессах принимают участие адгезины *Y. pseudotuberculosis*, продуцируемые *in vivo* как вне-, так и внутриклеточно (в последнем случае и InvA, биосинтез которого происходит

и при 37°C, но при слабокислых значениях pH [43]). Спектр и количественное представительство адгезинов на поверхности клетки возбудителя определяется совокупностью химических и физических характеристик среды, окружающей микроб в организме хозяина. Перечень адгезинов *Y. pseudotuberculosis* растет. Особый интерес к исследованию адгезивности этого возбудителя, как одного из представителей бактерий, вызывающих сапрозоонозные инфекции, придает чрезвычайная пластичность его метаболизма, обеспечивающая адаптацию микроба к экстремально меняющимся условиям обитания.

Статья подготовлена в рамках НИР по госзаданию № 20.6834.2017/БЧ Минобрнауки РФ.

Список литературы/References

1. Бывалов А.А., Кононенко В.Л., Кобышев И.В. Влияние О-боковых цепей липополисахарида на адгезивность *Yersinia pseudotuberculosis* к макрофагам J774, установленное методом оптической ловушки // Прикладная биохимия и микробиология. 2017. Т. 53, № 2. С. 234–243. [Byvalov A.A., Kononenko V.L., Konyshov I.V. Effect of lipopolysaccharide O-side chains on the adhesiveness of *Yersinia pseudotuberculosis* to J774 macrophages as revealed by optical tweezers. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya = Applied Biochemistry and Microbiology*, 2017, vol. 53, no. 2, pp. 258–266. (In Russ.)]
2. Бывалов А.А., Кононенко В.Л., Кобышев И.В. Исследование взаимодействия липополисахаридов *Yersinia pseudotuberculosis* с мембраной макрофага J774 методом силовой спектроскопии с использованием оптического пинцета // Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии. 2018. Т. 35, № 2. С. 115–130. [Byvalov A.A., Kononenko V.L., Konyshov I.V. Single-cell force spectroscopy of interaction of lipopolysaccharides from *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* with J774 macrophage membrane using optical tweezers. *Biologicheskie membrany: Zhurnal membranoj i kletchnoj biologii = Biological Membranes: Membrane and Cell Biology*, 2018, vol. 12, no. 2, pp. 93–106. (In Russ.)]
3. Бывалов А.А., Кобышев И.В., Новикова О.Д., Портнягина О.Ю., Белозеров В.С., Хоменко В.А., Давыдова В.Н. Адгезивность поринов OmpF и OmpC *Yersinia pseudotuberculosis* к макрофагам J774 // Биофизика. 2018. Т. 63, № 5. С. 913–922. [Byvalov A.A., Konyshov I.V., Novikova O.D., Portnyagina O.Yu., Belozеров V.S., Khomenko V.A., Davydova V.N. Adhesiveness of OmpF and OmpC porins from *Yersinia pseudotuberculosis* to macrophages J774. *Biofizika = Biophysics*, 2018, vol. 63, no. 5, pp. 913–922. (In Russ.)]
4. Сомов Г.П., Покровский В.И., Беседнова Н.Н., Антоненко Ф.Ф. Псевдотуберкулез. М.: Медицина, 2001. 256 с. [Somov G.P., Pokrovsky V.I., Besednova N.N., Antonenko F.F. *Pseudotuberculosis*. Moscow: Medicine, 2001. 256 p. (In Russ.)]
5. Чернядьев А.В., Бывалов А.А., Ананченко Б.А., Бушмелева Л.Г., Литвинцев С.Г. Морфологические особенности бактерий *Yersinia pseudotuberculosis*, выращенных при различных температурных условиях // Известия Коми НЦ УрО РАН. 2012. Т. 3, № 11. С. 57–60. [Chernyadyev A.V., Byvalov A.A., Ananchenko B.A., Bushmeleva L.G., Litvinets S.G. Morphological features of bacterium *Yersinia pseudotuberculosis* grown at different temperature conditions. *Izvestiya Komi NTS UrO RAN = Proceedings of the Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences*, 2012, vol. 3, no. 11, pp. 57–61. (In Russ.)]
6. Artner D., Oblak A., Ittig S., Garate J.A., Horvat S., Arriemerlou C., Hofinger A., Oostenbrink C., Jerala R., Kosma P., Zamyatina A. Conformationally constrained lipid A mimetics for exploration of structural basis of TLR4/MD-2 activation by lipopolysaccharide. *ACS Chem. Biol.*, 2013, vol. 8, no. 11, pp. 2423–2432. doi: 10.1021/cb4003199
7. Bao R., Nair M.K.M., Tang W.-K., Esser L., Sadhukhan A., Holland R.L., Xia D., Schifferli D.M. Structural basis for the specific recognition of dual receptors by the homopolymeric pH 6 antigen (Psa) fimbriae of *Yersinia pestis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013, vol. 110, no. 3, pp. 1065–1070. doi: 10.1073/pnas.1212431110
8. Ben-Efraim S., Aronson M., Bichowsky-Slomnicki L. New antigenic component of *Pasteurella pestis* formed under specified conditions of pH and temperature. *J. Bacteriol.*, 1961, vol. 81, no. 5, pp. 704–714.
9. Berne C., Ducret A., Hardy G.G., Brun Y.V. Adhesins involved in attachment to abiotic surfaces by Gram-negative bacteria. *Microbiol. Spectr.*, 2015, vol. 3, no. 4, pp. 1–45. doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0018-2015
10. Berne C., Ellison C.K., Ducret A., Brun Y.V. Bacterial adhesion at the single-cell level. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2018, pp. 1–12. doi: 10.1038/s41579-018-0057-5
11. Biedzka-Sarek M., Venho R., Skurnik M. Role of YadA, Ail, and lipopolysaccharide in serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. *Infect. Immun.*, 2005, vol. 73, no. 4, pp. 2232–2244. doi: 10.1128/IAI.73.4.2232-2244.2005
12. Chauhan N., Wrobel A., Skurnik M., Leo J.C. *Yersinia* adhesins: an arsenal for infection. *Proteomics Clin. Appl.*, 2016, vol. 10, no. 9–10, pp. 949–963. doi: 10.1002/prca.201600012
13. Chung L.K., Bliska J.B. *Yersinia* versus host immunity: how a pathogen evades or triggers a protective response. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2016, vol. 29, pp. 56–62. doi: 10.1016/j.mib.2015.11.001
14. Clark M.A., Hirst B.H., Jepson M.A. M-cell surface beta1 integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M-cells. *Infect. Immun.*, 2005, vol. 6, pp. 1237–1243.

15. Collyn F., Lety M.-A., Nair S., Escuyer V., Younes A.B., Simonet M., Marceau M. Yersinia pseudotuberculosis harbors a type IV pilus gene cluster that contributes to pathogenicity. *Infect. Immun.*, 2002, vol. 70, no. 11, pp. 6196–6205. doi: 10.1128/IAI.70.11.6196-6205.2002
16. Cozens D., Read R.C. Anti-adhesion methods as novel therapeutics for bacterial infections. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, 2012, vol. 10, no. 12, pp. 1457–1468. doi: 10.1586/eri.12.145
17. Doyle R.J. Contribution of the hydrophobic effect to microbial infection. *Microbes Infect.*, 2000, vol. 2, no. 4, pp. 391–400.
18. Dube P. Interaction of Yersinia with the gut: mechanisms of pathogenesis and immune evasion. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2009, vol. 337, pp. 61–91. doi: 10.1007/978-3-642-01846-6_3
19. El Tahir Y., Skurnik M. Yad A, the multifaceted Yersinia adhesin. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2001, vol. 291, pp. 209–218. doi: 10.1078/1438-4221-00119
20. Felek S., Lawrenz M.B., Krukoni E.S. The Yersinia pestis autotransporter YapC mediates host cell binding, autoaggregation and biofilm formation. *Microbiology*, 2008, vol. 154, pp. 1802–1812. doi: 10.1099/mic.0.2007/010918-0
21. Felek S., Tsang T.M., Krukoni E.S. Three Yersinia pestis adhesins facilitate Yop delivery to eukaryotic cells and contribute to plague virulence. *Infect. Immun.*, 2010, vol. 78, no. 10, pp. 4134–4150. doi: 10.1128/IAI.00167-10
22. Forman S., Wulff C.R., Myers-Morales T., Cowan C., Perry R.D., Straley S.C. yadBC of Yersinia pestis, a new virulence determinant for bubonic plague. *Infect. Immun.*, 2008, vol. 76, no. 2, pp. 578–587. doi: 10.1128/IAI.00219-07
23. Fredriksson-Ahomaa M., Joutsen S., Laukkanen-Ninios R. Identification of Yersinia at the species and subspecies levels is challenging. *Curr. Clin. Microbiol. Rep.*, 2018, vol. 5, no. 2, pp. 135–142. doi: 10.1007/s40588-018-0088-8
24. Galván E.M., Chen H., Schifferli D.M. The Psa fimbriae of Yersinia pestis interact with phosphatidylcholine on alveolar epithelial cells and pulmonary surfactant. *Infect. Immun.*, 2007, vol. 75, no. 3, pp. 1272–1279. doi: 10.1128/IAI.01153-06
25. Haiko J., Westerlund-Wikström B. The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. *Biology (Basel)*, 2013, vol. 2, no. 4, pp. 1242–1267. doi: 10.3390/biology2041242
26. Haji-Ghassemi O., Müller-Loennies S., Rodriguez T., Brade L., Kosma P., Brade H., Evans S.V. Structural basis for antibody recognition of lipid A: insights to polyspecificity toward single-stranded DNA. *J. Biol. Chem.*, 2015, vol. 290, no. 32, pp. 19629–19640. doi: 10.1074/jbc.M115.657874
27. Heise T., Dersch P. Identification of a domain in Yersinia virulence factor YadA that is crucial for extracellular matrix-specific cell adhesion and uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, vol. 103, no. 9, pp. 3375–3380. doi: 10.1073/pnas.0507749103
28. Hoiczky E., Roggenkamp A., Reichenbecher M., Lupas A., Heesemann J. Structure and sequence analysis of Yersinia YadA and Moraxella UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J.*, 2000, vol. 19, no. 22, pp. 5989–5999. doi: 10.1093/emboj/19.22.5989
29. Holtz O. Lipopolysaccharides of Yersinia. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2003, vol. 529, pp. 219–228. doi: 10.1007/0-306-48416-1_43
30. Huang X.Z., Lindler L.E. The pH 6 antigen is an antiphagocytic factor produced by Yersinia pestis independent of Yersinia outer proteins and capsule antigen. *Infect. Immun.*, 2004, vol. 72, pp. 7212–7219. doi: 10.1128/IAI.72.12.7212-7219.2004
31. Huber M., Kalis C., Keck S., Jiang Z., Georgel P., Du X., Shamel L., Sovath S., Mudd S., Beutler B., Galanos C., Freudenberg M.A. R-form LPS, the master key to the activation of TLR4/MD-2-positive cells. *Eur. J. Immunol.*, 2006, vol. 36, no. 3, pp. 701–711. doi: 10.1002/eji.200535593
32. Isberg R.R., Leong J.M. Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell*, 1990, vol. 60, no. 5, pp. 861–871.
33. Kim T.J., Young B.M., Young G.M. Effect of flagellar mutations on Yersinia enterocolitica biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, vol. 74, no. 17, pp. 5466–5474. doi: 10.1128/AEM.00222-08
34. Klana J., Zhang P., Schwartz O., Hull S., Chen T. The core lipopolysaccharide of Escherichia coli is a ligand for the dendritic-cell-specific intercellular adhesion molecule nonintegrin CD209 receptor. *J. Bacteriol.*, 2005, vol. 187, no. 5, pp. 1710–1715. doi: 10.1128/JB.187.5.1710-1715.2005
35. Krachler A.-M., Ham H., Orth K. Outer membrane adhesion factor multivalent adhesion molecule 7 initiates host cell binding during infection by Gram-negative pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, vol. 108, no. 28, pp. 11614–11619. doi: 10.1073/pnas.1102360108
36. Krachler A.-M., Orth K. Functional characterization of the interaction between bacterial adhesion multivalent adhesion molecule 7 (MAM7) protein and its host cell ligands. *J. Biol. Chem.*, 2007, vol. 286, no. 45, pp. 38939–38947. doi: 10.1074/jbc.M111.291377
37. Lawrenz M.B., Lenz J.D., Miller V.L. A novel autotransporter adhesin is required for efficient colonization during bubonic plague. *Infect. Immun.*, 2009, vol. 77, no. 1, pp. 317–326. doi: 10.1128/IAI.01206-08
38. Leo J.C., Grin I., Linde D. Type V secretion: mechanism(s) of autotransport through the bacterial outer membrane. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 2012, vol. 367, pp. 1088–1101. doi: 10.1098/rstb.2011.0208
39. Leo J.C., Skurnik M. Adhesins of human pathogens from the genus Yersinia. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2011, vol. 715, pp. 1–15. doi: 10.1007/978-94-007-0940-9_1
40. Lu Q., Wang J., Faghihnejad A., Zeng H., Liu Y. Understanding the molecular interactions of lipopolysaccharides during E. coli initial adhesion with a surface forces apparatus. *Soft Matter*, 2011, vol. 7, no. 19, pp. 9366–9379. doi: 10.1039/C1SM05554B
41. Mahmoud R.Y., Stones D.H., Li W., Emara M., El-Domany R.A., Wang D., Wang Y., Krachler A.M., Yu J. The multivalent adhesion molecule SSO1327 plays a key role in Shigella sonnei pathogenesis. *Mol. Microbiol.*, 2016, vol. 99, no. 4, pp. 658–673. doi: 10.1111/mmi.13255
42. Matsuura M., Kawasaka K., Kawahara K., Mitsuyama M. Evasion of human innate immunity without antagonizing TLR4 by mutant Salmonella enterica serovar typhimurium having penta-acylated lipid A. *Innate Immun.*, 2012, vol. 18, no. 5, pp. 764–773. doi: 10.1177/1753425912440599
43. Mikula K.M., Kolodziejczyk R., Goldman A. Yersinia infection tools — characterization of structure and function of adhesins. *Front Cell Infect. Microbiol.*, 2012, vol. 2, pp. 169. doi: 10.3389/fcimb.2012.00169
44. Miller V.L., Falkow S. Evidence for two genetic loci in Yersinia enterocolitica that can promote invasion of epithelial cells. *Infect. Immun.*, 1988, vol. 56, no. 5, pp. 1242–1248.

45. Muhlenkamp M., Oberhettinger P., Leo J.C., Linke D. Yersinia adhesin A (YadA) – beauty & beast. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2015, vol. 305, no. 2, pp. 252–258. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.12.008
46. Nair M.K., De Masi L., Yue M., Galván E.M., Chen H., Wang F., Schifferli D.M. Adhesive properties of YapV and paralogous autotransporter proteins of *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.*, 2015, vol. 83, no. 5, pp. 1809–1819. doi: 10.1128/IAI.00094-15
47. Paharik A.E., Horswill A.R. The Staphylococcal biofilm: adhesins, regulation, and host response. *Microbiol. Spectr.*, 2016, vol. 4, no. 2. doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0022-2015
48. Pakharukova N., Roy S., Tuittila M., Rahman M.M., Paavilainen S., Ingars A.K., Skaldin M., Lamminmäki U., Härd T., Teneberg S., Zavialov A.V. Structural basis for Myf and Psa fimbriae-mediated tropism of pathogenic strains of *Yersinia* for host tissues. *Mol. Microbiol.*, 2016, vol. 102, no. 4, pp. 593–610. doi: 10.1111/mmi.13481
49. Palumbo R.N., Wang C. Bacterial invasin: structure, function, and implication for targeted oral gene delivery. *Curr. Drug Deliv.*, 2006, vol. 3, no. 1, pp. 47–53. doi: 10.2174/156720106775197475
50. Patel S., Mathivanan N., Goyal A. Bacterial adhesins, the pathogenic weapons to trick host defense arsenal. *Biomed. Pharmacother.*, 2017, vol. 93, pp. 763–771. doi: 10.1016/j.biopha.2017.06.102
51. Payne D., Tatham D., Williamson E.D., Titball R.W. The pH 6 antigen of *Yersinia pestis* binds to beta1-linked galactosyl residues in glycosphingolipids. *Infect. Immun.*, 1998, vol. 66, no. 9, pp. 4545–4548.
52. Pierson D.E., Falkow S. The ail gene of *Yersinia enterocolitica* has a role in the ability of the organism to survive serum killing. *Infect. Immun.*, 1993, vol. 61, no. 5, pp. 1846–1852.
53. Pisano F., Kochut A., Uliczka F., Geyer R., Stolz T., Thiermann T., Rohde M., Dersch P. In vivo-induced InvA-like autotransporters Ipf and InvC of *Yersinia pseudotuberculosis* promote interactions with intestinal epithelial cells and contribute to virulence. *Infect. Immun.*, 2012, vol. 80, no. 3, pp. 1050–1064. doi: 10.1128/IAI.05715-11
54. Prokaryotes; vol. 2. Ed. Dworkin M. *New York: Springer*, 2006. 1107 p.
55. Reis R.S., Horn F. Enteropathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* and *Yersinia*: cellular aspects of host-bacteria interactions in enteric diseases. *Gut Pathog.*, 2010, vol. 2, no. 1: 8. doi: 10.1186/1757-4749-2-8
56. Ren Y., Wang C., Chen Z., Allan E., van der Mei H.C., Busscher H.J. Emergent heterogeneous microenvironments in biofilms: substratum surface heterogeneity and bacterial adhesion force-sensing. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2018, vol. 42, no. 3, pp. 259–272. doi: 10.1093/femsre/fuy001
57. Rossez Y., Wolfson E.B., Holmes A., Gally D.L., Holden N.J. Bacterial flagella: twist and stick, or dodge across the kingdoms. *PLoS Pathog.*, 2015, vol. 11, no. 1: e1004483. doi: 10.1371/journal.ppat.1004483
58. Sadana P., Geyer R., Pezoldt J., Helmsing S., Huehn J., Hust M., Dersch P., Scrima A. The invasin D protein from *Yersinia pseudotuberculosis* selectively binds the Fab region of host antibodies and affects colonization of the intestine. *J. Biol. Chem.*, 2018, vol. 293, no. 22, pp. 8672–8690. doi: 10.1074/jbc.RA117.001068
59. Sadana P., Mönnich M., Unverzagt C., Scrima A. Structure of the *Y. pseudotuberculosis* adhesin Invasin E. *Protein Sci.*, 2017, vol. 26, no. 6, pp. 1182–1195. doi: 10.1002/pro.3171
60. Schade J., Weidenmaier C. Cell wall glycopolymers of Firmicutes and their role as nonprotein adhesins. *FEBS Letters*, 2016, vol. 590, pp. 3758–3771. doi: 10.1002/1873-3468.12288
61. Shoaf-Sweeney K.D., Hutkins R.W. Adherence, anti-adherence, and oligosaccharides preventing pathogens from sticking to the host. *Adv. Food Nutr. Res.*, 2009, vol. 55, pp. 101–161. doi: 10.1016/S1043-4526(08)00402-6
62. Skurnik M. Molecular genetics, biochemistry and biological role of *Yersinia* lipopolysaccharide. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2003, vol. 529, pp. 187–197. doi: 10.1007/0-306-48416-1_38
63. Solanki V., Tiwari M., Tiwari V. Host-bacteria interaction and adhesin study for development of therapeutics. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2018, vol. 112, pp. 54–64. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.01.151
64. Strauss J., Burnham N.A., Camesano T.A. Atomic force microscopy study of the role of LPS O-antigen on adhesion of *E. coli*. *J. Mol. Recognit.*, 2009, vol. 22, no. 5, pp. 347–355. doi: 10.1002/jmr.955
65. Strong P.C., Hinchliffe S.J., Patrick H., Atkinson S., Champion O.L., Wren B.W. Identification and characterisation of a novel adhesin Ipf in *Yersinia pseudotuberculosis*. *BMC Microbiol.*, 2011, vol. 11: 85. doi: 10.1186/1471-2180-11-85
66. Tsai J.C., Yen M.R., Castillo R., Leyton D.L., Henderson I.R., Saier M.H. Jr. The bacterial intimins and invasins: a large and novel family of secreted proteins. *PLoS One*, 2010, vol. 5, no. 12: e14403. doi: 10.1371/journal.pone.0014403
67. Tsang T.M., Wiese J.S., Felek S., Kronshage M., Krukons E.S. Ail proteins of *Yersinia pestis* and *Y. pseudotuberculosis* have different cell binding and invasion activities. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 12: e83621. doi: 10.1371/journal.pone.0083621
68. Visser L.G., Annema A., van Furth R. Role of Yops in inhibition of phagocytosis and killing of opsonized *Yersinia enterocolitica* by human granulocytes. *Infect. Immun.*, 1995, vol. 63, no. 7, pp. 2570–2575.
69. Wang J., Katani R., Li L., Hegde N., Roberts E.L., Kapur V., DebRoy C. Rapid detection of *Escherichia coli* O157 and shiga toxins by lateral flow immunoassays. *Toxins (Basel)*, 2016, vol. 8, no. 4: 92. doi: 10.3390/toxins8040092
70. Williamson D.A., Baines S.L., Carter G.P., da Silva A.G., Ren X., Sherwood J., Dufour M., Schultz M.B., French N.P., Seemann T., Stinear T.P., Howden B.P. Genomic insights into a sustained national outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Genome Biol. Evol.*, 2016, vol. 8, no. 12, pp. 3806–3814. doi: 10.1093/gbe/evw285
71. Yamashita S., Lukacik P., Barnard T.J., Noinaj N., Felek S., Tsang T.M., Krukons E.S., Hinnebusch B.J., Buchanan S.K. Structural insights into Ail-mediated adhesion in *Yersinia pestis*. *Structure*, 2011, vol. 19, no. 11, pp. 1672–1682. doi: 10.1016/j.str.2011.08.010
72. Yang K., Park C.G., Cheong C., Bulgheresi S., Zhang S., Zhang P., He Y., Jiang L., Huang H., Ding H., Wu Y., Wang S., Zhang L., Li A., Xia L., Bartra S.S., Plano G.V., Skurnik M., Klena J.D., Chen T. Host Langerin (CD207) is a receptor for *Yersinia pestis* phagocytosis and promotes dissemination. *Immunol. Cell Biol.*, 2015, vol. 93, no. 9, pp. 815–824. doi: 10.1038/icb.2015.46
73. Yang Y., Merriam J.J., Mueller J.P., Isberg R.R. The psa locus is responsible for thermoinducible binding of *Yersinia pseudotuberculosis* to cultured cells. *Infect. Immun.*, 1996, vol. 64, no. 7, pp. 2483–2489.

74. Zhang P., Skurnik M., Zhang S.S., Schwartz O., Kalyanasundaram R., Bulgheresi S., He J.J., Klena J.D., Hinnebusch B.J., Chen T. Human dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin (CD209) is a receptor for *Yersinia pestis* that promotes phagocytosis by dendritic cells. *Infect. Immun.*, 2008, vol. 76, no. 5, pp. 2070–2079.
75. Zhang P., Snyder S., Feng P., Azadi P., Zhang S., Bulgheresi S., Sanderson K.E., He J., Klena J., Chen T. Role of N-acetylglucosamine within core lipopolysaccharide of several species of gram-negative bacteria in targeting the DC-SIGN (CD209). *J. Immunol.*, 2006, vol. 177, no. 6, pp. 4002–4011. doi: 10.4049/jimmunol.177.6.4002
76. Zhang S.S., Park C.G., Zhang P., Bartra S.S., Plano G.V., Klena J.D., Skurnik M., Hinnebusch B.J., Chen T. Plasminogen activator Pla of *Yersinia pestis* utilizes murine DEC-205 (CD205) as a receptor to promote dissemination. *J. Biol. Chem.*, 2008, vol. 283, no. 46, pp. 31511–31521. doi: 10.1074/jbc.M804646200

Авторы:

Бывалов А.А., д.м.н., профессор, зав. лабораторией физиологии микроорганизмов Института физиологии Коми научного центра УрО РАН, Вятский государственный университет, г. Киров, Россия;

Конышев И.В., к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории физиологии микроорганизмов Института физиологии Коми НЦ УрО РАН, Вятский государственный университет, г. Киров, Россия.

Authors:

Byvalov A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Microbial Physiology, Institute of Physiology of the Komi Science Center of the Ural Branch of the RAS, Vyatka State University, Kirov, Russian Federation;

Konyshov I.V., PhD (Biology), Junior Researcher, Laboratory of Microbial Physiology, Institute of Physiology of the Komi Science Center of the Ural Branch of the RAS, Vyatka State University, Kirov, Russian Federation.

Поступила в редакцию 17.09.2018
Отправлена на доработку 26.03.2019
Принята к печати 09.04.2019

Received 17.09.2018
Revision received 26.03.2019
Accepted 09.04.2019

IMPLEMENTATION OF THE PROGRAM OF MEASLES ELIMINATION IN THE WHO AFRICAN REGION

J. Camara^a, A.Yu. Antipova^b, M.A. Bichurina^b, V.V. Zarubaev^b, N. Magassouba^a, I.N. Lavrentieva^b

^a University Gamal Abdel Nasser, Conakry, Republic of Guinea

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

Abstract. The review is devoted to the analysis of the available literature on the elimination of measles. The review focuses on the current measles epidemic situation in the African Region (AFR) and the implementation of the WHO strategic plan for the elimination of measles in AFR by 2020. Measles in the AFR is characterized by a severe course with a high risk of death due to malnutrition, vitamin A deficiency, concomitant bacterial and viral infections, and malaria. In 2015, 105,256 cases of measles were reported in the WHO African Region, most of them among children under 5 years old, 79% of whom were not vaccinated or had unknown vaccine status. Initially, the strategy for implementing the measles elimination program in AFRs was based on a combination of immunization campaigns for children under 14 years of age (coverage of more than 90%) and routine vaccination of at least 90% of children aged 9–15 months. It was recommended to repeat the campaign of mass immunization of children aged 9 months up to 4 years every 3–5 years. The use of this strategy has reduced the number of measles cases by 83–97% during the first year of additional immunization programs. The recommended age of routine measles vaccination in AFRs is 9 months — a strategy to reduce infant mortality, including that due to complications of measles. In 2016, measles vaccination was introduced into the national immunization schedule in all AFR countries, and 24 countries introduced revaccination. Currently, the measles elimination program in a number of AFR countries is based on two-dose immunization (MCV1 and MCV2). The measles prevention program in a number of AFR countries was disrupted due to the Ebola epidemic. There are some common problems in the realization of the program in AFR countries. All AFR countries are committed to the measles elimination program. The review provides information on strategies and successes in overcoming challenges to achieve the goals set for the WHO African Region in the implementation of the programme of measles elimination.

Key words: measles, measles elimination program, Africa, vaccination, revaccination.

ОСУЩЕСТВЛЕНИЕ ПРОГРАММЫ ЭЛИМИНАЦИИ КОРИ В АФРИКАНСКОМ РЕГИОНЕ ВОЗ

Камара Дж.¹, Антипова А.Ю.², Бичурина М.А.², Зарубаев В.В.², Магассуба Н'Ф.¹, Лаврентьева И.Н.²

¹ Университет Гамалы Абдель Насера, Конакри, Республика Гвинея

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

Резюме. Обзор посвящен анализу имеющейся литературы по вопросам элиминации кори. Основное внимание в обзоре уделяется текущей ситуации с эпидемией кори в Африканском регионе ВОЗ. Освещаются основные

Адрес для переписки:

Антипова Анастасия Юрьевна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 (812) 232-94-11 (служебн.). Факс: 8 (812) 233-20-92.
E-mail: anti130403@mail.ru

Contacts:

Anastasiya Yu. Antipova
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 232-94-11 (office). Fax: +7 (812) 233-20-92.
E-mail: anti130403@mail.ru

Библиографическое описание:

Камара Дж., Антипова А.Ю., Бичурина М.А., Зарубаев В.В., Магассуба Н'Ф., Лаврентьева И.Н. Осуществление программы элиминации кори в Африканском регионе ВОЗ // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 3–4. С. 449–456. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-449-456

Citation:

Camara J., Antipova A.Yu., Bichurina M.A., Zarubaev V.V., Magassouba N., Lavrentieva I.N. Implementation of the program of measles elimination in the who African Region // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 3–4, pp. 449–456. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-449-456

события, связанные с выполнением Стратегического плана по элиминации кори Всемирной организации здравоохранения в Африканском регионе к 2020 г. Корь в Африканском регионе ВОЗ характеризуется тяжелым течением с высоким риском смерти из-за недоедания, дефицита витамина А, сопутствующих бактериальных и вирусных инфекций и малярии. В 2015 г. в Африканском регионе ВОЗ было зарегистрировано 105 256 случаев кори, большинство из них среди детей в возрасте до пяти лет, 79% из которых не были вакцинированы или имели неизвестный статус вакцины. Первоначально стратегия реализации программы ликвидации кори в Африканском регионе основывалась на сочетании кампаний иммунизации детей в возрасте до 14 лет с охватом более 90% и плановой вакцинации не менее 90% детей в возрасте 9–15 месяцев. Было рекомендовано повторять кампанию массовой иммунизации детей в возрасте от девяти месяцев до четырех лет каждые 3–5 лет. Использование данной стратегии позволило сократить число случаев кори на 83–97% в течение первого года выполнения дополнительных программ иммунизации. Рекомендуемый возраст плановой вакцинации против кори в Африканском регионе ВОЗ составляет девять месяцев — это стратегия снижения младенческой смертности, в том числе из-за осложнений кори. В 2016 г. вакцинация против кори была включена в Национальный график иммунизации во всех странах Африки, а в 24 странах была введена ревакцинация. В настоящее время программа элиминации кори в ряде стран в Африканском регионе ВОЗ опирается на две дозы иммунизации (MCV1 и MCV2). Программа профилактики кори в ряде стран Африки была сорвана из-за последней эпидемии геморрагической лихорадки Эбола. Существуют некоторые общие для всех регионов ВОЗ проблемы в реализации программы элиминации кори, которые характерны также для стран Африки. В обзоре содержится информация о стратегиях и успехах в преодолении проблем, связанных с достижением целей, поставленных перед Африканским регионом ВОЗ в ходе осуществления программы элиминации кори.

Ключевые слова: корь, программа элиминации кори, Африка, вакцинация, ревакцинация.

Introduction

In 1989 the World Health Assembly, and in 1990 the Meeting of Heads of State on child health set the goal of reducing measles morbidity and mortality by 90% and 95%, respectively. According to the WHO Advisory group (1996), the presence of only one host (human), a typical clinical manifestation, long-term immunity after the disease, a single antigenic variant and the absence of asymptomatic carriage of the virus makes it possible to eliminate measles worldwide [2, 14].

In 2012, 194 states — members of the World Health Assembly approved the Global plan of vaccine-related activity, whose task was the improvement of health through the dissemination of comprehensive benefits of immunization to all people, regardless of ethnic, social, religious, and other differences [4]. The WHO measles strategy suggested a single vaccination for at least 90% of the target population. In many African countries, seroconversion was only 85% after single vaccination at 9 months of age, i.e. 15% of children remained unprotected. A two-dose immunization scheme (vaccination and revaccination) ensures measles elimination at the national level [2]. A global laboratory network for the diagnosis of measles and rubella has been established to monitor measles and to prove elimination of infection [10].

The Strategic plan for measles elimination by 2020 (WHO, 2012) included a 95% reduction in measles mortality compared to 2000, and elimination of the disease in at least five WHO regions, including Africa [42]. The review is devoted to the

analysis of the available literature on the elimination of measles and focuses on the current measles epidemic situation in the African Region (AFR).

The WHO African region (AFR) comprises 47 countries. The population of Africa is about 1 billion people and, according to the forecast of HSBC Bank (Hong Kong and Shanghai Banking Corporation), will double by 2050 [6].

Clinical characteristics of measles in the AFR

Measles, a systemic disease, is accompanied in Africa by severe malnutrition, lack of vitamin A, as well as co-infection with specific pathogens of bacterial, viral and parasitic nature [22]. In a typical case (moderate form) in nonimmune persons after the incubation period, prodromal symptoms are observed: fever, weakness, cough, runny nose and conjunctivitis. The pathognomonic sign is the presence of typical Belsky–Filatov–Koplik spots on the mucous membrane of the cheeks and lips that can be found in 80% patients 2 days before the rash. Macula-papular rash spreads from the face to the limbs and torso in 3–7 days and is accompanied by high temperature. Then the change in the color of the elements of the rash and their peeling occur (pigmentation period). Patients are contagious throughout the prodromal period and up to 4 days from the onset of rash [5, 41].

In the WHO African region, approximately one third of measles cases are associated with complications. These include ulceration of the oral mucosa, laryngotracheobronchitis (croup), pneumonia, in-

fection of the ears and sinuses, persistent diarrhea. In South Africa, pneumonia and/or diarrhea were reported to be the most common cause of hospitalization of measles-infected children [22]. In Uganda 136 out of 171 children with measles developed bronchopneumonia [15]. Corneal desiccation and ulceration are less common (1–4% of children with measles), although measles causes about half of childhood blindness in Africa [19, 22, 41]. The risk of coinfection with other pathogens or death persists for several months after recovery from acute measles [48]. Among vaccinated people, the number of measles cases with complications is significantly lower compared to unvaccinated ones [18].

Measles on the African continent is one of the main causes of child mortality, especially in children under 5 years of age, which is up to 10% of all child deaths in the region [32, 41]. In Uganda, up to 2000's the mortality rate was 20 to 23%; among the dead 55% were children 6 to 18 months. The cause of death in most cases was lung damage caused by measles virus, but not secondary infections [15]. In 2009–2010, in one of the hospitals in Cape Town, 15 of the 18 children who died of measles (3% of the total number of hospitalized) were younger than one year [22]. Overall, since 2013, measles in AFR results in about 40,000 deaths each year.

Measles incidence in AFR

The largest measles outbreaks were observed in 1992 (South Africa) [22], 1996 (Botswana, Lesotho, Malawi, Namibia, South Africa, Swaziland, Zimbabwe) [49]. After launching the immunization program, the incidence of measles has declined, the number of reported cases decreased from 520,102 cases in 2000 to the historical minimum of 37,012 cases in 2008. In seven South African countries, the number of measles cases reported annually was less than 1 per million population between 2006 and 2008 [35]. However, the level of vaccination coverage achieved could not prevent major measles outbreaks in subsequent years.

In 2010–2011, about 200,000 cases of measles were reported annually in the African region (figure 1) [24]. In 2012, the number of suspected cases of measles in AFR was 106,052, the incidence rate being 118.8 per 1 million population. The number of confirmed cases of measles in the region decreased from 43,800 in 2011 up to 25,905 in 2012; the incidence of confirmed cases being 50.4 and 29.0 per 1 million population, respectively. Large outbreaks of measles were reported in Angola, the Democratic Republic of the Congo (DRC), Nigeria, Ethiopia [11, 24, 26]. In 2013, 71,529 measles cases were confirmed in AFR. In 2015 105,256

cases of measles were detected in the WHO African region, the majority of them among children under 5 years of age. Meanwhile, 79% of these children were not vaccinated or no information about vaccination has been presented. In 2016, 62,293 suspected cases of measles were detected, the highest incidence of measles was in Equatorial Guinea (1938 per 1 million population). However, in 15 AFR countries the incidence rate was less than 1 case per 1 million population [25].

The measles prevention program has been disrupted in some countries of the African region by the humanitarian crisis associated with the Ebola epidemic [37]. The most affected countries in West Africa were Guinea, Liberia and Sierra Leone. According to the national vaccination schedules, vaccination against measles in these countries is carried out once in 9 months. In the Republic of Guinea, vaccination coverage decreased from 90.5% in 2012 to 52% in 2015 [25]. According to our data of serological monitoring, a total of 12.3% of the surveyed persons in the Republic of Guinea were measles-negative. Antibodies to the measles virus have not been revealed or were determined in low titers in 76.2% of patients under the age of 22, probably as a result of violations of vaccination schedule [1, 7, 8, 9]. However, all patients aged 23 years and older were seropositive for measles virus, 60% of them having high antibody titers, indicating a recent history of measles. In 2016, 289 confirmed cases of measles were registered in the Republic of Guinea, in January–March 2017 there was an outbreak of measles (3991 cases); 4 deaths were registered in patients with a diagnosis of measles [47].

In Liberia, vaccine coverage reached 74% in 2013, 58% in 2014 and 64% in 2015. During the Ebola epidemic not a single case of measles was detected; but in 2015 and 2016 433 and 400 confirmed cases were discovered, respectively. The Ministry of Health of the country officially recognized that the measles epidemic was the result of the lack of its vaccine prophylaxis as a result of the Ebola epidemic [12]. In countries where the Ebola epidemic has ended, the World Health Organization recommended that routine vaccination should be resumed and special attention should be paid to children who may have missed immunization.

The Democratic Republic of the Congo (DRC) is one of the poorest countries in the world in terms of measles. Measles vaccine is given once to children 9–11 months old [20, 42]. Additional vaccination of children aged 6 to 59 months old every three years was carried out in 2002–2004 and 2006–2007, while 2010–2013 was marked by political instability in the DRC. The measles outbreak began in the South-East of the country in Katanga province, bordering Zambia. Starting from week 1, 2010

to week 45, 2013, 294,455 cases of measles and 5,045 cases of measles-driven death have been reported. The mortality rate was 1.7% among the reported cases. Between 2011 and 2014, the proportion of cases in the DRC ranged from 45 to 69% of all measles cases reported in the AFR [23, 46]. More than 18.5 million children were vaccinated in response to outbreaks in 2013–2014. Vaccination coverage increased to 79% in 2015 [20, 25, 28, 29, 30], which was not enough to stop the epidemic. In 2016, 13,817 suspected measles cases were reported, 178 of them being fatal. The incidence rate, taking into account only confirmed cases of measles, was 61.7 per 1 million population. In 2017, 2,150 cases of measles were confirmed.

In 2013, 57,892 cases were reported during the outbreak in Nigeria, accounting for 30% of all measles cases in AFR. Nigeria is the largest African country in terms of number of population. In 2013, the Nigerian authorities declared martial law in three northern states in connection with the activities of the terrorist Islamist group Boko Haram. The humanitarian crisis has resulted in the resettlement of people to other states of Nigeria and neighbouring countries, with more than 1.4 million displaced persons living in more than 100 camps. The coverage rate of a single-dose measles vaccine was below 55% over a long period of time. In 2015, 24,421 suspected measles cases were reported, 127 of which were fatal [13, 25, 34]. More than 77% of children under 5 years of age were not vaccinated, and this group had the highest number of cases. To prevent the spread of outbreaks, mass vaccination campaigns for children over 6 months of age have been conducted since 12 January 2017, and 4,766,214 children have been vaccinated, first those living in resettlement camps, and then all children in the conflict-affected states of North-Eastern Nigeria [45].

As noted earlier, measles in Africa is predominantly found in young children [11, 30, 31]. There were no statistically significant differences in the incidence of measles among males and females [18]. The peak of morbidity is usually observed during the dry season [16].

Measles surveillance system in AFR

AFR health care system is based on the regional principle, i.e. medical centers cover certain areas.

The first serious attempt of surveillance for measles in the WHO African region was the adoption of a program with the participation of 20 African countries in 1966. The expanded program of immunization (EPI), initiated by WHO in 1978, included operational research, technical assistance, collaboration with other groups, and the development

of national immunization programs [32]. In 1986, along with EPI, virological surveillance of measles has been introduced. The goal of the EPI for the African region was to make measles immunization available to all children by 1990 and to ensure at least 75% vaccination coverage. In 1991, however, measles vaccination coverage for children aged 12 to 23 months in Africa was only 54% [17].

In 2000, the African regional office of WHO proposed a plan to reduce measles mortality by more than 50% by 2005 [49]. The strategy included global immunization campaigns for children aged 1 to 14 years; routine immunization for at least 90% of children aged 9–15 months and the subsequent campaign of immunization of all children at the age of 9 months to 4 years every 3–5 years in order to involve those children who have not been vaccinated within the calendar period or who have not responded to the previous vaccination. Mass immunization campaigns was supposed to include large populations (whole country or its region) and cover more than 90% of susceptible populations [2]. In 2002, a measles surveillance system was introduced in all countries of the WHO African region based on the investigation of each suspected measles case with laboratory confirmation of the diagnosis [38]. Measles surveillance included the collection of data on cases of exanthema diseases with fever and rash (two or more per 100,000 population), the study of blood samples in one (or more) suspected measles cases in $\geq 80\%$ of the territories, and 100% reporting in all territories [40]. The African region has achieved a 90% reduction in measles mortality compared to estimates in 2000 by the end of 2006 [3].

In 2008, 46 WHO member States of the African region adopted the goal of measles pre-elimination by the end of 2012. This goal, however, was not achieved [39]. In 2009, the Regional Committee for Africa set and in 2011 approved the goal of measles elimination by 2020 [40, 43]. All 47 countries in the WHO African Region joined this plan [42].

Global laboratory network for surveillance for measles and rubella in the WHO in 2012 supported the standardized methods and quality assurance in 44 laboratories of 42 member States in the WHO African region; 43 countries reported data on supervision of measles on the basis of the investigation of each case, and all States have provided annual reports through a single reporting form about the number of measles cases. In 2012, 19 countries were investigating 2 or more cases of illness with fever per 100,000 population and a study of blood samples from 1 or more suspected measles cases in $\geq 80\%$ of [26].

Currently, measles surveillance in the WHO African Region is integrated into global epidemio-

logical surveillance of other vaccine-preventable diseases (acute flaccid paralysis, yellow fever, neonatal tetanus). For AFR, a suspected measles outbreak is defined as 5 or more suspected measles cases reported within one month in a health facility or district with known transmission routes. In this case, an epidemiological investigation should be carried out [41]. Suspected measles is any case of rash, fever, cough, runny nose or conjunctivitis. Suspicious cases are confirmed on the basis of laboratory tests, epidemiological links and clinical criteria. Laboratory confirmation of the diagnosis of measles in all sporadic cases and at least one case in the epidemic chain is a prerequisite for further measures for elimination of the infection [16, 41, 48].

Endemic transmission of the measles virus in AFR

Molecular studies based on the analysis of the variable region of the nucleoprotein gene (450 nt) of the measles virus under a single Protocol (WHO, 1998) are a mandatory part of measles surveillance. According to the principles of nomenclature and names of isolated measles viruses, 22 specific genotypes and 1 possible new one (g3) have been described. Genetically related genotypes are combined into genetic lines (A, B, C, D, E, F, G, H) [44].

In the WHO African region, measles viruses of D2, D4, D8 and D10 genotypes have been detected since the early 2000's. However, the most commonly identified measles viruses are of genetic line B. Genotype B2 is constantly circulating in West Africa. Genotype B3, which includes three sub-genotypes (B3.1, v3.2 and v3.3), is widely distributed in countries of the WHO African region, and was identified in different years in many African States [16, 21, 31, 33, 35, 44].

In 2013–2016, according to WHO, all 249 measles virus isolates from 14 countries of the African region were of genotype B3 [25]. Viruses of genetic line B are endemic to the African region, and their transmission continues.

Vaccination against measles

Since 2001, AFR has started programs of supplementary immunization activities (SIAs) for children aged 9 months to 14 years. In Central Africa large immunization campaigns were carried out in 2002 — 2004, then in 2006 and 2007. However, the vaccination coverage was below 95%. In 2008, a total of 7.7 million infants (27% of children born the current year) did not receive a single-dose measles vaccine [24].

Currently, one- and two-dose vaccination strategies are used [38]. Routine one-dose vaccina-

tion in all States is carried out mainly at the age of 9 months. Two-times immunization against measles has been introduced into the national immunization schedule in 25 AFR countries, a second dose of measles — containing vaccine is planned in Cameroon, Comoros, Uganda; a similar option is being considered in Mali and Mauritania [25, 26]. Revaccination is carried out in most countries at the age of 15–18 months. Immunization is also carried out through supplementary immunization programs (campaigns). For some countries, SIAs is the only way to vaccinate the population [24, 32]. The implementation of the SIAs is supported by national budgets and a coalition of partners: the American Red Cross, the United Nations Foundation, UNICEF, WHO and CDC [27].

Overall, by 2010 the coverage of single-dose measles vaccination in the African region had increased to 75%. During 2011–2012, approximately 133 million children have been vaccinated in the course of 35 supplementary vaccination campaigns.

In 2013–2016 52 SIAs have been realized in 42 AFR countries, which have involved about 300 million children. Vaccination coverage during the supplementary immunization campaign was at least 95%. In 2015, the highest vaccination coverage rates were achieved in Mauritania (99%), Tanzania (99%) and Seychelles (98%); the lowest ones were achieved in Southern Sudan (20%), Equatorial Guinea (27%) and the Central African Republic (49%) [25]. In 2016, single-dose vaccine coverage in AFR was 72%, and double-dose — 24%. Scheduled SIAs were planned in 28 countries of the WHO African region, including Côte d'Ivoire, Guinea, Nigeria and Sierra Leone in 2017 and Chad, Equatorial Guinea, Guinea Bissau and South Sudan in 2018 [24].

Thus, the coverage of one dose of measles vaccine in AFR does not exceed 75% over a long period of time, which is not sufficient to prevent the spread of measles in the region.

Conclusion

There are problems with the measles elimination programme that are common to different WHO regions. This is an incomplete list: untimely diagnosis of diseases, untimely beginning and incomplete volume of anti-epidemic measures in the outbreak site, incorrect determination of the number of vaccinations, insufficient explanatory work with the population and others.

All AFR countries are committed to the measles elimination program. According to available literature data the high level of vaccination coverage in the WHO African region is hampered by the inaccessibility of territories and population groups, poor communication, lack of roads, the problem of keeping

temperature regimen in the course of vaccines transportation, lack of medical personnel, active population movement and military conflicts [29, 33].

Health care therefore needs to be improved. Currently, not all measles-infected patients receive necessary medical care, and not all measles cases are reported [29]. Some health centers and laboratories are insufficiently equipped. The population is not sufficiently informed about the benefits of vaccination. In Nigeria alone, more than 4,000 vaccination teams were needed to implement SIAs [45]. Many African countries have begun to train national staff for immunization.

In developing countries, WHO recommended age for the first dose of measles vaccine is 7 to 9 months. Single immunization of children under one year

of age is not sufficient to prevent measles outbreaks. In Nigeria, for instance, as much as 54% of laboratory-confirmed measles patients were vaccinated [18].

WHO notes that errors in classification, reporting of measles cases in large outbreaks, submission of incomplete reports, lack of staff for databases filling, and errors in summarizing consolidated reporting can distort the true level of morbidity.

The purpose of surveillance for measles in countries of AFR with a low incidence of measles — increase coverage of second dose of the vaccine, surveillance for measles by the standards of elimination, broad coverage SIAs. Countries with high morbidity need to address a range of issues, including legal, political, health system strengthening, etc. [26, 36].

Список литературы/References

1. Антипова А.Ю., Бичурина М.А., Лаврентьева И.Н., Тотолян А.А. Корь в странах Африканского региона ВОЗ на этапе элиминации инфекции // Актуальные инфекции в Гвинейской Республике: эпидемиология, диагностика и иммунитет / Под ред. А.Ю. Поповой. СПб.: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2017. С. 264–278. [Antipova A.Yu., Bichurina M.A., Lavrentyeva I.N., Totolyan A.A. Measles in the WHO African region at the stage of elimination of infection. In: Actual infections in the Republic of Guinea: epidemiology, diagnosis and immunity. Ed. A.Yu. Popova. *St. Petersburg: St. Petersburg Pasteur Institute, 2017, pp. 264–278. (In Russ.)*]
2. Бектимиров Т.А. Стратегия ВОЗ по глобальной ликвидации кори // Вакцинация. Новости вакцинопрофилактики. 2002. Т. 4, № 22. [Bektimirov T.A. WHO Strategy for the global elimination of measles. *Vaccinacija. Novosti vakcinoprofilaktiki = Vaccination. Vaccine Prevention News, 2002, vol. 4, no. 22. (In Russ.)*. URL: <https://medi.ru/info/6823> (20.08.2019)]
3. ВОЗ. Глобальная ликвидация кори. Доклад Секретариата. Пункт 11.15 предварительной повестки дня. 63 сессия Всемирной Ассамблеи Здравоохранения, А63/18, 25 марта 2010 г. [WHO. Global measles eradication. secretariat report. Item 11.15 of the provisional agenda. 63rd World Health Assembly. A63/18. 25 March 2010. (In Russ.)]
4. ВОЗ. Десятилетие вакцин — Глобальный план действий в отношении вакцин на 2011–2020 гг. [WHO. The Global Vaccine Action Plan 2011–2020. (In Russ.)]
5. Корь / Под ред. В.Ф. Попова. М.: Медицина, 1985. 264 с. [Measles. Ed. V.F. Popov. *Moscow: Medicine, 1985. 264 p. (In Russ.)*]
6. Мир в 2050 году. Количественная оценка сдвигов в глобальной экономике (доклад банка HSBC). [The world in 2050. Quantifying shifts in the global economy (HSBC report). (In Russ.)]
7. Попова А.Ю., Бичурина М.А., Лаврентьева И.Н., Железнова Н.В., Антипова А.Ю., Щербакова С.А., Буаро М.Й., Тотолян Арег А. Изучение уровня иммунитета к вирусу кори в отдельных группах населения Гвинейской Республики в рамках глобальной программы элиминации кори // Актуальные инфекции в Гвинейской Республике: эпидемиология, диагностика и иммунитет / Под ред. А.Ю. Поповой. СПб.: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2017. С. 279–284. [Popova A.Yu., Bichurina M.A., Lavrentyeva I.N., Zheleznova N.V., Antipova A.Yu., Shcherbakova S.A., Bouaro M.Th., Totolian Areg A. Study of the level of immunity to the measles virus in certain groups of the population of the Republic of Guinea in the framework of the global measles elimination program. In: Actual infections in the Republic of Guinea: epidemiology, diagnosis and immunity. Ed. A.Yu. Popova. *St. Petersburg: St. Petersburg Pasteur Institute, 2017, pp. 279–284. (In Russ.)*]
8. Попова А.Ю., Бичурина М.А., Лаврентьева И.Н., Железнова Н.В., Антипова А.Ю., Щербакова С.А., Буаро М.Й., Тотолян Арег А. Изучение уровня иммунитета к вирусу кори в отдельных группах населения Гвинейской Республики в рамках глобальной программы элиминации кори. Сообщение 1 // Инфекция и иммунитет. 2016. Т. 6, № 4. С. 353–358. [Popova A.Yu., Bichurina M.A., Lavrentyeva I.N., Zheleznova N.V., Antipova A.Yu., Shcherbakova S.A., Boiro M.Y., Totolian Areg A. Measles virus immunity level study in particular population groups of the republic of guinea within the framework of global measles elimination program. Report 1. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2016, vol. 6, no. 4, pp. 353–358. doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-353-358 (In Russ.)*]
9. Попова А.Ю., Бичурина М.А., Лаврентьева И.Н., Железнова Н.В., Антипова А.Ю., Щербакова С.А., Буаро М.Й., Тотолян Арег А. Изучение уровня иммунитета к вирусу кори в отдельных группах населения Гвинейской Республики в рамках глобальной программы элиминации кори. Сообщение 2 // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 1. С. 79–84. [Popova A.Yu., Bichurina M.A., Lavrentyeva I.N., Zheleznova N.V., Antipova A.Yu., Shcherbakova S.A., Boiro M.Y., Totolian Areg A. Measles virus immunity level study in particular population groups of the republic of guinea within the framework of global measles elimination program. Report 2. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2017, vol. 7, no.1, pp.79–84. doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-353-358 (In Russ.)*]
10. Accelerating progress towards measles/rubella control and elimination goals. Laboratory Recommendations. The 14th Global Measles and Rubella Laboratory Network Meeting. *Geneva, 21–23 June 2016.*
11. Akalu H.B. Review on measles situation in ethiopia; past and present. *J. Trop. Dis., 2015, vol. 4, pp. 193.*
12. Andrews N.M. Liberia, Chad top measles deaths. URL: <https://allafrica.com/stories/201603290762.html> (20.08.2019)

13. Bassey B.E., Gasasira A., Weldegabriel G., Sylvester M.T., Richard K.I., Thompson I., Benjamin A., Agwai S., Akpan G.U. Impact of a nationwide measles immunization campaign and routine immunization in Nigeria, 2006–2010: a critical review of South-South, Nigeria. *Sci. J. Public Health.*, 2015, vol. 3, no. 5, pp. 693–698.
14. Center for Disease Control and Prevention. Measles eradication: recommendations from a meeting cosponsored by the WHO, the PAHO and CDC. *MMWR*, 1997, vol. 46, no. RR-II, pp. 1–20.
15. Debusse P.J., Lewis M.G., Mugerwa J.W. Pulmonary complications of measles in Uganda. *J. Trop. Pediatr.*, 1970, vol. 16, no. 4, pp. 197–203.
16. Dia N., Fall A., Ka R., Fall A., Kiori D.E., Goudiaby D.G., Fall A.D., Faye el H.A., Dosseh A., Ndiaye K., Diop O.M., Niang M.N. Epidemiology and genetic characterization of measles strains in Senegal, 2004–2013. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 5: e0121704. doi: 10.1371/journal.pone.0121704
17. Effects of health programs on child mortality in Sub-Saharan Africa. Eds. Ewbank D.C., Gribble J.N. Washington, DC: The National Academies Press, 1993. 208 p. doi: 10.17226/2208
18. Faneye A.O., Adeniji J.A., Olusola B.A., Motayo B.O., Akintunde G.B. Measles virus infection among vaccinated and unvaccinated children in Nigeria. *Viral Immunol.*, 2015, vol. 28, no. 6, pp. 304–308. doi: 10.1089/vim.2014.0118
19. Foster A., Johnson G.J. Measles corneal ulceration and childhood blindness: prevention and treatment. *Trop. Doct.*, 1988, vol. 18, no. 2, pp. 74–78.
20. Gil Cuesta J., Mukembe N., Valentiner-Branth P., Stefanoff P., Lenglet A. Measles vaccination coverage survey in Moba, Katanga, Democratic Republic of Congo, 2013: need to adapt routine and mass vaccination campaigns to reach the unreached. *PLoS Curr.*, 2015, pp. 1. doi: 10.1371/currents.outbreaks.8a1b00760dfd81481eb42234bd18ced3
21. Global distribution of measles and rubella genotypes — update. *Wkly Epidemiol. Rec.*, 2006, vol. 81, no. 51/52, pp. 474–480.
22. Le Roux D.M., Le Roux S.M., Nuttall J.J., Eley B.S. South African measles outbreak 2009–2010 as experienced by a paediatric hospital. *S. Afr. Med. J.*, 2012, vol. 102, no. 9, pp. 760–764. doi: 10.7196/SAMJ.5984
23. Mancini S., Coldiron M.E., Ronsse A., Ilunga B.K., Porten K., Grais R.F. Description of a large measles epidemic in Democratic Republic of Congo, 2010–2013. *Conf. Health.*, 2014, vol. 8, pp. 9. doi: 10.1186/1752-1505-8-9
24. Masresha B.G. Measles pre-elimination and resurgence in the African region. Global Measles Management Meeting Geneva 15–17 March 2011. URL: <https://www.slideserve.com/magar/measles-pre-elimination-and-resurgence-in-the-african-region> (20.08.2019)
25. Masresha B.G., Dixon M.G., Kriss J.L., Katsande R., Shibeshi M.E., Luce R., Fall A., Dosseh A.R.G.A., Byabamazima C.R., Dabbagh A.J., Goodson J.L., Mihigo R. Progress toward measles elimination — African Region, 2013–2016. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.*, 2017, vol. 66, no. 17, pp. 436–443.
26. Masresha B.G., Kaiser R., Eshetu M., Katsande R., Luce R., Fall A., Dosseh A.R.G.A., Naouri B., Byabamazima Ch.R., Perry R., Dabbagh A.J., Strebel P., Kretsinger K., Goodson J.L., Nshimirimana D. Progress toward measles preelimination — African region, 2011–2012. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.*, 2014, vol. 63, no. 13, pp. 285–291.
27. Measles Mortality Reduction — West Africa, 1996–2002. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.*, 2004, vol. 53, no. 2, pp. 28–30.
28. Médecins Sans Frontières: Children who survived measles are now suffering from malnutrition and malaria. 24 Februar 2016. URL: http://www.ecoi.net/local_link/320406/459656_de.html (12.08.2019)
29. Médecins Sans Frontières. Democratic Republic of Congo: Fighting measles in South Kivu. 8 February 2017. URL: <http://www.msf.org/en/article/democratic-republic-congo-fighting-measles-south-kivu> (12.08.2019)
30. Médecins Sans Frontières. Measles: mass vaccination in Katanga, DR Congo. 2008. URL: <http://www.msf.org.uk/article/measles-mass-vaccination-katanga-dr-congo> Accessed on february 2014 (12.08.2019)
31. Ntshoe G.M., McAnerney J.M., Archer B.N., Smit S.B., Harris B.N., Tempia S., Mashele M., Singh B., Thomas J., Cengimbo A., Blumberg L.H., Puren A., Moyes J., van den Heever J., Schoub B.D., Cohen C. Measles Outbreak in South Africa: epidemiology of laboratory-confirmed measles cases and assessment of intervention, 2009–2011. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 2: e55682. doi: 10.1371/journal.pone.0055682
32. Ofosu-Amaah S. The control of measles in Tropical Africa: a review of past and present efforts. *Rev. Infect. Dis.*, 1983, vol. 5, no. 3, pp. 546–553.
33. Pan American Health Organization. Global Measles Eradication: Target 2010? *EPI Newsletter*. 1996, vol. 18, no. 4, pp. 1–3.
34. Saleh J.E.A. Trends of measles in Nigeria: a systematic review. *Sahel Med. J.*, 2016, vol. 19, pp. 5–11.
35. Shibeshi M.E., Masresha B.G., Smit S.B., Biellik R.J., Nicholson J.L., Muitherero C., Shivute N., Walker O., Reggis K., Goodson J.L. Measles resurgence in southern Africa: challenges to measles elimination. *Vaccine*, 2014, vol. 32, no. 16, pp. 1798–1807.
36. Strebel P., WHO, IVB/EPI. Status of Measles and Rubella Elimination — Regions and Global. Closing immunity gaps in older children and adults towards measles and rubella elimination: lessons learned and challenges. 10 May 2016.
37. Takahashi S., Metcalf S.J. E., Ferrari M. J., Moss W.J., Truelove S.A., Tatem A.J., Grenfell B.T., Lessler J. Reduced vaccination and the risk of measles and other childhood infections post-Ebola. *Science*, 2015, vol. 347, no. 6227, pp. 1240–1242.
38. Uzicanin A., Eggers R., Webb E., Harris B., Durrheim D., Ogunbanjo G., Isaacs V., Hawkrigde A., Biellik R., Strebel P. Impact of the 1996–1997 supplementary measles vaccination campaigns in South Africa. *Int. J. Epidemiol.*, 2002, vol. 31, no. 5, pp. 968–976.
39. WHO. African Region. Measles outbreaks and progress towards meeting measles pre-elimination goals. *Wkly Epidemiol. Rec.*, 2011, vol. 13, no. 14, pp. 129–136.
40. WHO. African regional guidelines for measles surveillance. *Brazzaville, Congo: World Health Organization*. 2011.
41. WHO. African regional guidelines for measles and rubella surveillance. 2015.
42. WHO. Global measles and rubella strategic plan: 2012–2020. *Geneva, Switzerland: World Health Organ*. 2012.
43. WHO. Measles elimination by 2020—a strategy for the African Region. *Geneva, Switzerland: World Health Organization, Regional Office for Africa*. 2011.
44. WHO. Measles virus nomenclature update: 2012. *Wkly Epidemiol. Rec.*, 2012, vol. 87, no. 9, pp. 73–80.
45. WHO. Millions of children to receive measles vaccine in north-eastern Nigeria. URL: <http://www.who.int/features/2017/measles-vaccination-nigeria/en>

46. WHO. Progress towards measles pre-elimination, African Region, 2011–2012. *Wkly Epidemiol. Rec.*, 2014, vol. 13, no. 89, pp.141–152.
47. WHO. Reported measles cases and incidence rates by WHO Member States 2016, 2017 as of 11 April 2017. URL: http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/active/measles_monthlydata/en/index1.html
48. WHO. Treating measles in children. WHO/EPI/TRAM/97.02. 2004: 64. URL: http://www.who.int/immunization/programmes_systems/interventions/TreatingMeaslesENG300.pdf
49. Yishay A.B., Kranker K. All-cause mortality reductions from measles catchup campaigns in Africa. *J. Hum. Res.*, 2015, vol. 50, no. 2, pp. 516–547.

Авторы:

Камара Дж., научный сотрудник лаборатории геморрагических лихорадок Университета Гамалья Абдель Насера, Конакри, Гвинейская Республика;

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

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

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

Магассуба Н'Ф., к.б.н., зав. лабораторией геморрагических лихорадок Университета Гамалья Абдель Насера, Конакри, Гвинейская Республика;

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

Authors:

Camara J., Researcher, Laboratory of Hemorrhagic Fevers, Gamal Abdel Nasser University, Conakry, Republic of Guinea;

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

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

Zarubaev V.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Experimental Virology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Magassouba N'F., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Hemorrhagic Fevers, Gamal Abdel Nasser University, Conakry, Republic of Guinea;

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

Поступила в редакцию 07.06.2019
Отправлена на доработку 13.09.2019
Принята к печати 17.09.2019

Received 07.06.2019
Revision received 13.09.2019
Accepted 17.09.2019

ВАКЦИНА ПРОТИВ *HELICOBACTER PYLORI*: МИФ ИЛИ РЕАЛЬНОСТЬ?

Ю.П. Успенский^{1,2}, Н.В. Барышникова^{2,3}, Е.И. Ермоленко³, А.Н. Суворов³,
А.В. Сварваль⁴

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

² ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова
МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В обзорной статье представлены сведения о результатах современных исследований, посвященных разработке вакцин против *H. pylori*. К сожалению, вакцина, которая могла бы быть рекомендована к использованию у человека, пока не существует, несмотря на более чем 30-летнюю историю создания и большое количество примеров эффективности вакцин у животных. Механизмы действия вакцин у животных и человека ясны недостаточно и нуждаются в дальнейшем уточнении. Также еще не полностью изучены побочные эффекты вакцинации против *H. pylori*. Длительное пребывание *H. pylori* в просвете желудка ограничивает возможности клеточного иммунитета (эффект в основном связан с антителами и антимикробными пептидами), приводит к низкой эффективности системной иммунизации и слабому иммунному ответу. Дополнительные сложности при формировании естественного и искусственного (при вакцинации) иммунного ответа обусловлены высокой изменчивостью возбудителя и низкой иммуногенностью его антигенов. Выбор антигена является ключевым аспектом создания любой вакцины. Для создания как монокомпонентных, так и многокомпонентных вакцин против *H. pylori* важной является информация об основных антигенах возбудителя. В качестве антигенов для иммунизации против *H. pylori* предлагались некоторые факторы, вовлеченные в патогенетические механизмы развития хеликобактериоза: VacA, CagA, NapA, BabA, SabA и уреазы. Использование вакцин на основе этих белков являлось эффективным в профилактике экспериментального инфицирования у животных. Использование очищенных антигенов микроба успешно индуцирует защитные механизмы для борьбы с инфекцией, что продемонстрировано в исследованиях на животных (профилактических и лечебных протоколах). Ассоциация двух или трех антигенов может вызвать более сильный иммунный ответ, чем использование одного антигена. В настоящее время уреазы является наиболее перспективным кандидатом и ее ценность в качестве вакцинного антигена была подтверждена многочисленными исследованиями на мышах, хорьках и приматах. Остается неясным, какой способ введения вакцины против *Helicobacter pylori* более эффективен. Сравнение способов введения вакцин показало, что интраназальная и ректальная иммунизация мышей создавали более существенную защиту от хеликобактерной инфекции по сравнению с оральной вакцинацией. Разработка антихеликобактерной вакцины оказалась достаточно сложным проектом в силу перечисленных патофизиологических, иммунологических и технологических трудностей, которые сохраняют свою актуальность и по сей день. На сегодняшний день перспективным направлением в совершенствовании вакцин против хеликобактерий является использование мукозальных адъювантов и создание рекомбинантных штаммов пробиотиков, экспрессирующих антигены *H. pylori* и использование пробиотиков для стимуляции специфического иммунного ответа на фоне вакцинации.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, вакцины, иммунизация, цитотоксины Cag, энтерококки, пробиотики.

Адрес для переписки:

Барышникова Наталья Владимировна
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12А,
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.
Тел.: 8 921 301-33-77 (моб.).
E-mail: baryshnikova_nv@mail.ru

Contacts:

Natalia V. Baryshnikova
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Akademika
Pavlova str., 12A, Research Institute of Experimental Medicine.
Phone: +7 921 301-33-77 (mobile).
E-mail: baryshnikova_nv@mail.ru

Библиографическое описание:

Успенский Ю.П., Барышникова Н.В., Ермоленко Е.И., Суворов А.Н.,
Сварваль А.В. Вакцина против *Helicobacter pylori*: миф или
реальность? // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 3–4. С. 457–466.
doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-457-466

Citation:

Uspenskiy Yu.P., Baryshnikova N.V., Ermolenko E.I., Suvorov A.N., Svarval A.V.
Anti-*Helicobacter pylori* vaccine: myth or reality? // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 3–4,
pp. 457–466. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-457-466

ANTI-HELICOBACTER PYLORI VACCINE: MITH OR REALITY?Uspenskiy Yu.P.^{a,b}, Baryshnikova N.V.^{b,c}, Ermolenko E.I.^c, Suvorov A.N.^c, Svarval A.V.^d^a St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation^b I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation^c Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation^d St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Here we review the data on the current studies aimed at developing anti-*Helicobacter pylori* vaccines. Unfortunately, no vaccines recommended for use in human are available now, despite a more than 30-year history of their development and a great body of evidence on vaccine efficiency in animals. Mechanisms underlying vaccine-related effects in animals and human are poorly determined and expect to be further clarified. Moreover, side effects related to vaccines have not investigated in detail. A long-lasting stay of *H. pylori* in the gastric lumen restricts potential protective effects of host cellular immunity (an effect is mainly associated with antibodies and antimicrobial peptides), that results in low efficacy of systemic immunization and weak immune response. In addition, further complications in developing natural and artificial (vaccination) immune response may be due to the high pathogen variability and low immunogenicity of related antigens. A choice of antigen is crucial upon generating any vaccine. The data on the main pathogen-derived antigens is of high importance while generating both mono- and multicomponent *H. pylori* vaccines. A number of various antigens was proposed for immunization against *H. pylori*, some of which are involved in the pathogenetic mechanisms of *Helicobacter pylori* infection: VacA, CagA, NapA, BabA, SabA and urease. Such vaccines turned out to be efficient in preventing experimental infection in animals. The use of purified microbial antigens successfully induces protective mechanisms to fight against infection, as demonstrated in animal studies (preventive and therapeutic protocols). Compared to using a single antigen, an association of two or three antigens can trigger stronger immune response. Currently, bacterial urease is considered as the most promising candidate antigen, which has been proved to be a valuable a vaccine antigen in numerous studies with mice, ferrets and primates. It remains unclear which route of administration for *Helicobacter pylori* vaccine would be superior compared to the remainder. Comparing various routes of vaccine administration demonstrated that that mice immunized intranasally and intrarectally resulted in markedly higher protection against *Helicobacter pylori* infection compared to oral vaccination. Development of *H. pylori* vaccine faced substantial obstacles due to the pathophysiological, immunological and technological challenges noted above, still remaining an issue so far. At present, a promising approach in advancing *H. pylori* vaccines is based on using mucosal adjuvants and generation of recombinant probiotics expressing *H. pylori*-derived antigens for triggering specific immune response upon vaccination.

Key words: *Helicobacter pylori*, vaccines, immunization, cytotoxins Cag, *Enterococcus* spp., probiotics.

Согласно международным рекомендациям, проведение эрадикации *Helicobacter pylori* рекомендуется всем инфицированным пациентам, в том числе с целью профилактики рака желудка [26, 41]. Большое внимание уделяется различным способам оптимизации и усовершенствования схем антихеликобактерной терапии с использованием богатого арсенала фармпрепаратов, биологически активных добавок и немедикаментозных способов лечения [1]. Однако использование многокомпонентных схем антихеликобактерной терапии имеет ряд недостатков: а) формирование антибиотикорезистентности; б) недостаточная приверженность пациентов к лечению; в) побочные эффекты антибиотикотерапии; г) экономический барьер при использовании антибиотиков для широкой профилактики язвенной болезни и рака желудка. В связи с этим не прекращаются попытки создания вакцины против *H. pylori*, успешное внедрение которой в широкую медицинскую практику может кардинальным образом изменить подход к ведению пациентов с *H. pylori*-ассоциированными заболеваниями [4, 17]. Предположительно, процесс повыше-

ния содержания иммунокомпетентных клеток в слизистой оболочке желудка на ранних этапах патогенеза хеликобактериоза приводит к истощению механизмов защиты и диктует необходимость стимуляции выработки факторов защиты посредством иммунизации (иммунизационно-стимулированной защиты) [38]. При вакцинации развивается не только специфический иммунный ответ за счет выработки антител, но и клеточный и гуморальный ответ, что должно обеспечивать полноценную защиту от *H. pylori*.

История создания вакцин против *Helicobacter pylori*

Попытки разработать вакцину против *H. pylori* продолжаются уже более 25 лет. В первой экспериментальной работе на мышах *per os* использовался лизат *H. pylori* с холерным токсином [9]. В первом клиническом исследовании использовалась пероральная терапевтическая вакцина, состоящая из рекомбинантной уреазы и термолабильного токсина *E. coli* в качестве

адьюванта [31]. В последующем были проведены еще несколько клинических исследований по оценке различных вариантов вакцин против *H. pylori* [2, 23, 27], которые показали невысокую эффективность, что в основном связано с недостаточным адьювантным эффектом термолабильного токсина *E. coli*. Современный этап изучения проблемы (2010–2017 гг.) характеризуется: а) изменением акцента с терапевтической на превентивную иммунизацию, в связи с чем в первую очередь вакцина разрабатывается для детей; б) введением вакцины большим когортам пациентов детского возраста; в) применением новых мукозальных адьювантов.

Особенности хеликобактерной инфекции и разработка вакцины

Особенностью хеликобактерной инфекции у людей является возможность длительного персистирования *H. pylori* в желудке несмотря на низкие значения рН и сравнительное небольшое количество факторов роста с учетом предпочтения голофитного способа питания бактериями. Длительное пребывание *H. pylori* в просвете желудка ограничивает возможности клеточного иммунитета (эффект в основном связан с антителами и антимикробными пептидами), приводит к низкой эффективности системной иммунизации и слабому иммунному ответу. Дополнительные сложности при формировании естественного и искусственного (при вакцинации) иммунного ответа обусловлены высокой изменчивостью возбудителя и низкой иммуногенностью его антигенов.

Разработка антихеликобактерной вакцины оказалась достаточно сложным проектом в силу перечисленных патофизиологических, иммунологических и технологических трудностей, которые сохраняют свою актуальность и по сей день. К ним можно отнести: важность использования мощного (и при этом безопасного) мукозального адьюванта, адекватный способ введения профилактических препаратов. Согласно данным ряда работ, наиболее эффективными путями введения вакцины являются внутримышечный и интраназальный, менее эффективны — интрагастральный и ректальный [19, 47]. Интересным является тот факт, что иммунизация против *H. pylori* препятствует колонизации слизистой оболочки желудка бактериями толстой кишки, что еще раз демонстрирует связь между хеликобактерной инфекцией и дисбиозом кишечника [3]. В связи с этим целесообразно рассматривать пробиотики в качестве средств, обеспечивающих не только коррекцию дисбиотических состояний, но и стимулирующих иммунный ответ.

Выбор антигенов и способов введения одно- и многокомпонентных вакцин

Выбор антигена является ключевым аспектом создания любой вакцины. Для создания как монокомпонентных, так и многокомпонентных вакцин против *H. pylori* важным является информация об основных антигенах возбудителя (табл.) [1, 32].

В качестве антигенов для иммунизации против *H. pylori* предлагались некоторые факторы, вовлеченные в патогенетические механизмы развития хеликобактериоза: VacA, CagA, NapA, BabA, SabA и уреазы. Использование вакцин на основе этих белков являлось эффективным в профилактике экспериментального инфицирования у животных [12, 20]. Использование очищенных антигенов микроба успешно индуцирует защитные механизмы для борьбы с инфекцией, что продемонстрировано в исследованиях на животных (профилактических и лечебных протоколах) [45]. Ассоциация двух или трех антигенов может вызвать более сильный иммунный ответ, чем использование одного антигена. У мышей вакцинный препарат, состоящий из HspA и субъединицы В уреазы, индуцировал более высокий уровень защиты, чем любой из указанных антигенов отдельно [15]. Комбинация уреазы и цитотоксина VacA у мышей, зараженных *H. pylori*, также оказалась высокоэффективной [16]. Феномен, присутствующий у мышей, требует анализа и при создании вакцины для людей.

В настоящее время уреазы является наиболее перспективным кандидатом и ее ценность в качестве вакцинного антигена была подтверждена многочисленными исследованиями на мышах, хорьках и приматах [22, 29, 40]. Уреазы обеспечивала защиту от инфекции *Helicobacter pylori* при пользовании либо в виде нативного белка, либо в виде ферментативно неактивного рекомбинантного белка [15, 28, 30]. Кроме того, терапевтический эффект иммунизации слизистой оболочки также наблюдался у мышей после введения лизатов *H. felis* и цитотоксинов *H. pylori* [14].

Остается неясным, какой способ введения вакцины против *Helicobacter pylori* более эффективен. Сравнение способов введения вакцин показало, что интраназальная и ректальная иммунизация мышей создавали более существенную защиту от хеликобактерной инфекции по сравнению с оральной вакцинацией [21, 24].

Оптимальной стратегией создания вакцин против хеликобактерной инфекции является стратегия возможности использования разрабатываемых вакцин у людей [18].

Таблица. Отдельные антигены *H. pylori* и их роль в патогенезе хеликобактериозаTable. Some *H. pylori*-derived antigens and their role in pathogenesis of helicobacteriosis

Гены, кодирующие синтез фактора патогенности The genes encoding synthesis of the pathogenicity factor	Факторы патогенности (белок) Factors of pathogenicity (protein)	Свойства факторов патогенности Properties of pathogenicity factors
<i>ahpC</i> (alkyl hydroperoxide reductase)	AhpC	Обеспечивает защиту <i>H. pylori</i> от оксидативного стресса Provides protection of <i>H. pylori</i> against oxidative stress
<i>babA1</i> , <i>babA2</i> (blood group antigen-binding adhesion)	BabA1, BabA2	Фактор адгезии, рецептор клеток Lewis, предположительно связан с более высокой частотой развития язвенной болезни двенадцатиперстной кишки, осложнений инфекции <i>H. pylori</i>, а также с аденокарциномой желудка (BabA2) The adhesion factor, the Lewis cell receptor, presumably associated with an increased incidence of duodenal ulcer, complications of <i>H. pylori</i> infection, and gastric adenocarcinoma (BabA2)
<i>cagA</i> (cytotoxin-associated gene)	CagA	Цитотоксин, маркер «острова патогенности» <i>H. pylori</i>, способствует повышению активности антрального гастрита, участвует в язвообразовании, развитии атрофии, в процессе дегенерации и разрушения межклеточного матрикса и базальной мембраны, опухолевой инвазии и метастазировании, стимуляции выработки IL-8, связан со снижением эффективности эрадикации <i>H. pylori</i> A cytotoxin, marker of the <i>H. pylori</i> "pathogenicity island", promotes an increased antral gastritis activity, involved in ulceration, development of atrophy, degradation and destruction of the intercellular matrix and basement membrane, tumor invasion and metastasis, stimulation of IL-8 production, and associated with reduced efficiency of <i>H. pylori</i> eradication
<i>cagC</i> (cytotoxin-associated gene)	CagC	Цитотоксин, стимулирует выработку IL-8 Cytotoxin, stimulates production of IL-8
<i>cagE</i> (cytotoxin-associated gene)	CagE	Цитотоксин, стимулирует выработку IL-8 Cytotoxin, stimulates production of IL-8
<i>cagF</i> (cytotoxin-associated gene)	CagF	Цитотоксин, вовлечен в процесс распознавания и доставки CagA в каналы T4SS (type IV secretion system) Cytotoxin, involved in the process of recognizing and delivering CagA to the T4SS (type IV secretion system) channels
<i>cagH</i> (cytotoxin-associated gene)	CagH	Цитотоксин, маркер интактного острова патогенности, стимулирует выработку IL-8 Cytotoxin, a marker of intact island pathogenicity, stimulates the production of IL-8
<i>flaA</i> , <i>flaB</i> (flagellin A- and B-subunit)	FlaA, FlaB	Обеспечивают подвижность Responsible for cell mobility
<i>hopQ</i> , <i>hopP</i> , <i>hopZ</i> (HP outer membrane protein)	HopQ, HopP, HopZ	Обеспечивают колонизацию и обсеменение слизистой оболочки желудка Provides bacterial colonization and dissemination of the gastric mucosa
<i>hpaA</i> (adhesion gene of <i>H. pylori</i>)	HpaA	Фактор адгезии An adhesion factor
<i>iceA1</i> , <i>iceA2</i> (induced by contact with epithelium)	IceA1, IceA2	Фактор адгезии An adhesion factor
<i>napA</i> (neutrophil-activating protein)	NapA	Активатор нейтрофилов и окислительного стресса, способен индуцировать процесс освобождения свободных радикалов в нейтрофилах, что приводит к повреждению слизистой оболочки желудка человека Activates neutrophils and oxidative stress, able to induce free radicals release in neutrophils, which leads to damage of the human gastric mucosa
<i>oipA</i> (outer inflammatory protein)	OipA	Поддерживает воспаление слизистой оболочки желудка, связан с секрецией IL-8 и IL-6, со степенью обсемененности <i>H. pylori</i> слизистой оболочки желудка, выраженностью нейтрофильной инфильтрации, с развитием интерстициальной метаплазии Supports inflammation of the gastric mucosa, associated with the secretion of IL-8 and IL-6, degree of <i>H. pylori</i> dissemination on gastric mucosa, severity of neutrophil infiltration, and development of interstitial metaplasia

Гены, кодирующие синтез фактора патогенности The genes encoding synthesis of the pathogenicity factor	Факторы патогенности (белок) Factors of pathogenicity (protein)	Свойства факторов патогенности Properties of pathogenicity factors
sabA (sialic acid-binding adhesin)	SabA	Поддерживает воспаление, способствует персистенции инфекции <i>H. pylori</i> Supports inflammation, promotes persistence of <i>H. pylori</i> infection
ureA, ureB, ureC, ureI	UreA, UreB, UreC, Urel	Уреаза является собственно маркером инфекции <i>H. pylori</i> и фактором защиты микроорганизма от действия соляной кислоты, обеспечивает длительное персистирование <i>H. pylori</i> в желудке человека, усиливает воспалительные реакции посредством активации моноцитов, нейтрофилов, секреции цитокинов, образования свободных радикалов и окиси азота. Считается, что большая субъединица уреазы — UreB — действует как аттрактант для лейкоцитов Urease serves as a sole marker of <i>H. pylori</i> infection and defense factor protecting the microorganism from hydrochloric acid, ensures a prolonged <i>H. pylori</i> persistence in the human stomach, enhances inflammatory responses by activating monocytes, neutrophils, cytokine secretion, formation of free radicals and nitric oxide. It is believed that a large urease subunit — UreB — acts as a chemoattractant for leukocytes
vacA (vacuolating-associated cytotoxin)	VacA	Цитотоксин, фактор адгезии, достоверно уменьшает скорость реэпителизации экспериментальных язв и пролиферацию эпителиоцитов за счет нарушения целостности цитоскелета, обеспечивает пассивный транспорт мочевины через эпителиальные клетки желудка, влияет на выживание <i>H. pylori</i> в клетках хозяина, стимулирует апоптоз клеток Cytotoxin, an adhesion factor, significantly reduces the rate of re-epithelialization of experimental ulcers and proliferation of epithelial cells by altering cytoskeletal integrity, provides passive urea transport across the stomach epithelial cells, affects survival of <i>H. pylori</i> in host cells, and stimulates cell apoptosis
rdxA (oxygen-insensitive NADPH nitroreductase), frxA (NADPH flavin oxidoreductase), fdxB (ferredoxin-like protein)	RdxA, FrxA, FdxB	Ферменты окислительного метаболизма, участвуют в формировании резистентности к метронидазолу Enzymes of oxidative metabolism, participate in the formation of metronidazole resistance
23S rRNA	Точечные мутации A2144G, A2143G, A2143C, A2115C, A2142G, C2182T, T2717C Point mutations	Участвуют в формировании резистентности к кларитромицину Participate in formation of clarithromycin resistance
sodB	Супероксиддисмутаза Superoxidedismutase	Позволяет <i>H. pylori</i> подавлять иммунный ответ организма хозяина, катализируя реакцию превращения бактерицидных соединений кислорода, высвобождаемых активированными в результате инфекции нейтрофилами, в кислород и воду, являющиеся безвредными для микроба Allows <i>H. pylori</i> to suppress host immune response by converting bactericidal oxygen species released by activated neutrophil during ongoing infection to oxygen and water harmless to the microbe
kat	Каталаза Catalase	Позволяет <i>H. pylori</i> подавлять иммунный ответ организма хозяина, катализируя реакцию превращения бактерицидных соединений кислорода, высвобождаемых активированными в результате инфекции нейтрофилами, в кислород и воду, являющиеся безвредными для микроба Allows <i>H. pylori</i> to suppress host immune response by converting bactericidal oxygen species released by activated neutrophil during ongoing infection to oxygen and water harmless to the microbe

Существуют данные в отношении перорального назначения здоровым добровольцам рекомбинантной *Salmonella* Ty21a (аттенуированная вакцина, разрешенная для использования у людей против *Salmonella* spp.), экспрессирующей субъединицу А уреазы, которые показали, что данный препарат хорошо переносится, но не обеспечивает полноценной защиты против инфекции [2].

Многообещающим исследованием считается работа Malfertheiner P. и соавт., в которой изучали безопасность и иммуногенетику вакцины для внутримышечного введения, содержащей рекомбинантные VacA, CagA и NapA на гидроксиде алюминия, у 57 здоровых *H. pylori*-отрицательных добровольцев в рандомизированном слепом исследовании первой фазы с различными сроками и дозировками вакцины. Все лица, прошедшие вакцинацию, были обследованы через 5 и 36 месяцев после вакцинации, через 18 и 24 месяца после первой вакцинации. В результате установлено, что при всех вариантах иммунизации имела место выработка специфического иммуноглобулина IgG и активация клеточного ответа в отношении одного или двух белков, а в 86% случаев — всех трех антигенов. При этом число побочных эффектов было мало [27].

Остальные исследования проводятся на животных, преимущественно на мышах. Morihara F. и соавт. (2008) идентифицировали область генома бактерии, названную UREB138, которая играет важную роль в формировании уреазной активности. Подкожная иммунизация с использованием UREB138 снижает степень обсемененности *H. pylori* слизистой оболочки желудка. Эта защита ассоциируется с повышением уреазо-специфических антител и Th1-клеточного ответа [33]. При интраназальном введении мышам вакцины, содержащей Sydney I штамм *H. pylori* и холерный токсин, также получены положительные результаты, иммунологически проявляющиеся в повышении продукции IFN γ , T-клеточного ответа, стимуляции секреции хемокинов (MIP-2, KC, LIX), которые атакуют нейтрофилы в желудке и играют важную роль в эрадикации микроорганизма [13]. Zhao W. и соавт. (2007) разработали уникальную вакцину, используя субъединицу уреазы В и токсин холеры В: рекомбинантный пептид, названный StUBE. В этой работе использовались липосомы для инкапсуляции антигена и, соответственно, его защиты от преждевременной деградациии при пероральном введении. Преимуществами этой вакцины является пероральный путь назначения. Кроме того, секреторный иммуноглобулин IgA слизистой оболочки желудка повышался у мышей, принимающих StUBE-1-липосомную вакцину, что говорит об активации механизмов

защиты [50]. Однако у мышей с мутантными генами секреторного IgA и IL-10 может развиваться постиммунизационный гастрит, что позволяет ряду ученых ставить под сомнение теорию об исключительно положительном влиянии секреторного IgA на макроорганизм [7]. Тем не менее в других работах установлено положительное влияние усиленного секреторного IgA-ответа [35]. Sutton P. и соавт. (2007) разработали рекомбинантную вакцину на основе HpaA *H. pylori* и холерного токсина [42]. Перспективным является создание вакцин на основе флагеллинов, участвующих в обеспечении подвижности бактерии [37, 42].

Другим вариантом доставки антигенов микроба является их векторная доставка. Xu C. и соавт. (2007) создали рекомбинантный штамм *Salmonella*, экспрессирующий уреазу *H. pylori* и IL-2. У мышей, иммунизированных вакциной, содержащей *Salmonella*, экспрессирующую уреазу *H. pylori* и IL-2, определялось более выраженное снижение показателей быстрого уреазного теста по сравнению с мышами, иммунизированными *Salmonella*, экспрессирующей только уреазу В. На основании этого можно сделать вывод, что эффекты антихеликобактерных вакцин зависят не только от бактериальных факторов, но и факторов хозяина (организма человека). Уровень IFN γ и белка-дефензина-1 в желудке также повышается на фоне иммунизации и рассматривается как непосредственный защитный фактор [19, 38, 46].

Неудачей закончились исследования на мышиной модели хеликобактериоза вакцин, полученных на основе рекомбинантного пробиотического штамма *Lactococcus lactis* MG1363, содержащего в геноме гены, кодирующие субъединицу В уреазы. Введение рекомбинантного штамма в качестве средства доставки антигена приводило к формированию специфического гуморального иммунитета, однако высокие титры антител к уреазе сохранялись кратковременно [25]. Непродолжительная эффективность рекомбинантного пробиотического штамма могла быть связана не с особенностями иммуномодулирующей активности пробиотика, а с низкой иммуногенностью выбранного антигена. Использование рекомбинантных пробиотических штаммов лактобацилл, лактококков и энтерококков для создания вакцинных препаратов для профилактики инфекций, вызванных стрептококками, листериями, сальмонеллами и патогенными эшерихиями является весьма перспективным направлением, поскольку имеется возможность стимуляции выработки специфических иммуноглобулинов за счет прямого воздействия поверхностных структур перечисленных молочнокислых бактерий. Особенно нужно отметить способность

последних нивелировать дисбиотические нарушения, часто сопровождающие хеликобактерную инфекцию.

Подтверждена эффективность ДНК-вакцин у мышей с помощью вакцины на основе субъединицы В уреазы [39]. Также доказано снижение вероятности развития гастрита, индуцированного *H. pylori* у мышей, после введения ДНК-вакцины, кодирующей белок теплового шока микроорганизма [43].

Потенциальными преимуществами ДНК-вакцин являются простота приготовления и использования (могут использоваться вместе с едой), температурная стабильность и стимуляция цитотоксического Т-клеточного ответа, что важно для лечения и профилактики хеликобактериоза [10]. Механизмы активности ДНК-вакцин изучены недостаточно. Теоретически они безопасны, но не следует забывать о том, что интеграция ДНК в клетки макроорганизма может способствовать развитию анти-ДНК-аутоиммунной реакции.

При разработке вакцин против *H. pylori* в основном используют уреазу как антиген выбора, однако есть ряд исследователей, акцентирующих внимание на других генах, например, CagL [8, 11, 44].

Крайне актуальным и перспективным является разработка многокомпонентных вакцин, применение которых может обеспечить более высокую эффективность вакцинации [5].

Мукозальные адъюванты: путь к повышению эффективности вакцины против *H. pylori*

Ключ к повышению эффективности вакцин против *H. pylori* заключается в поиске эффективных мукозальных адъювантов. Существенный прогресс в последние годы произошел в отношении мукозальных адъювантов. Nedrud J. и соавт. [34] провели исследование, демонстрирующее что СТА1-DD, дериват холерного токсина, не только безопасный, но и крайне эффективный мукозальный адъювант при интраназальном пути введения. Chionh Y. и соавт. [6] показали работу мукозальных адъювантов в серии экспериментов, используя в вакцине против *H. pylori* в качестве адъюванта белки теплового шока. При введении через респираторный тракт данная вакцина не только стимулировала выработку мукозальных антител, но и обеспечивала защиту в отношении уменьшения выраженности постиммунизационного воспаления. Ottso L. и соавт. [36] исследовали возможности создания вакцины против *H. pylori*, используя нетоксичный мутант токсина *E. coli* (R192G/L211A) (dm2T) в качестве мукозального адъю-

ванта. Zhang H. и соавт. [49] исследовали возможности рекомбинантного *Lactococcus lactis*, содержащего антиген UreB *H. pylori* и IL-2 в отношении стимуляции выработки антиуреазных антител у мышей.

Поскольку на сегодняшний день основной задачей является разработка эффективной вакцины, побочные эффекты вакцин против *H. pylori* изучаются не столь подробно и глубоко. Однако для них характерны общие нежелательные поствакцинальные явления, такие как повышение температуры, локальное покраснение и болезненность, образование инфильтрата в месте инъекции, а также аллергические реакции.

Клиническая трансляция

Одним из наиболее интересных исследований возможности применения вакцин против *H. pylori* у людей является двойное слепое, плацебо-контролируемое клиническое исследование Zeng M. и соавт. (2015), в котором в качестве первичной конечной точки оценивалась частота встречаемости инфекции *H. pylori* через год после вакцинации здоровых детей (6–15 лет), ранее не инфицированных данным микроорганизмом. 4464 ребенка в период с декабря 2004 по март 2005 г. были рандомизированы в соотношении 1:1 в группы вакцина (n = 2232) : плацебо (n = 2232), из которых 4403 прошли полный трехкратный курс вакцинации. В результате исследования было выявлено, что в течение первого года наблюдения имело место 64 случая первичного заражения микроорганизмом: 14 случаев в группе вакцины и 50 случаев в группе плацебо. Была рассчитана эффективность вакцины, которая составила 71,8% (95% CI 48,2–85,6). 157 (7%) участников из группы вакцины и 161 (7%) участник из группы плацебо имели побочные нежелательные реакции, при этом серьезные нежелательные реакции (не связанные с приемом вакцины) были зарегистрированы у пяти (< 1%) испытуемых из группы вакцины и у семи (< 1%) — в группе плацебо. На основании проведенного исследования было сделано заключение, что пероральная рекомбинантная вакцина против *H. pylori* является эффективной, безопасной и иммуногенной у *H. pylori*-негативных детей. Однако необходимо дальнейшее длительное наблюдение для подтверждения защитной роли вакцины против *H. pylori*-ассоциированных заболеваний [48].

Заключение

К сожалению, вакцины, которая могла бы быть рекомендована к использованию у человека, пока не существует, несмотря на более

чем 30-летнюю историю их создания и большое количество примеров эффективности вакцин у животных. Механизмы действия вакцин у животных и человека ясны недостаточно и нуждаются в дальнейшем уточнении. На сегодняшний день перспективным направлением в совершенствовании вакцин против *H. pylori* является поиск эффективных мукозальных

адьювантов и использование иммуностимулирующих пробиотиков во время введения вакцины или рекомбинантных полезных бактерий, экспрессирующих иммуногенные антигены *H. pylori*. Не следует забывать, что побочные эффекты вакцинации против *H. pylori* еще не полностью изучены, что также требует совершенствования методов создания вакцин.

Список литературы/References

1. Успенский Ю.П., Суворов А.Н., Барышникова Н.В. Инфекция *Helicobacter pylori* в клинической практике. СПб.: ИнформМед, 2011. 572 с. [Uspenskiy Y.P., Suvorov A.N., Baryshnikova N.V. *Helicobacter pylori* infection in clinical practice. St. Petersburg: Informmed, 2011. 572 p. (In Russ.)]
2. Aebischer T., Bumann D., Epple H.J., Metzger W., Schneider T., Cherepnev G., Walduck A.K., Kunkel D., Moos V., Loddenkemper C., Jiadze I., Panasyuk M., Stolte M., Graham D.Y., Zeitz M., Meyer T.F. Correlation of T cell response and bacterial clearance in human volunteers challenged with *Helicobacter pylori* revealed by randomised controlled vaccination with Ty21a-based *Salmonella* vaccines. *Gut*, 2008, vol. 57 (8), pp. 1065–1072. doi: 10.1136/gut.2007.145839
3. Aebischer T., Fischer A., Walduck A., Schlotelburg C., Lindig M., Schreiber S., Meyer T.F., Bereswill S., Gobel U.B. Vaccination prevents *Helicobacter pylori*-induced alterations of the gastric flora in mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2006, vol. 46, pp. 221–229. doi: 10.1111/j.1574-695X.2005.00024.x
4. Aebischer T., Schmitt A., Walduck A.K., Meyer T.F. *Helicobacter pylori* vaccine development: facing the challenge. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2005, vol. 295, pp. 343–353. doi: 10.1016/j.ijmm.2005.06.005
5. Anderl F., Gerhard M. *Helicobacter pylori* vaccination: Is there a path to protection? *World J. Gastroenterol.*, 2014, vol. 20 (34), pp. 11939–11949. doi: 10.3748/wjg.v20.i34.11939
6. Chionh Y.T., Arulmuruganar A., Venditti E., Ng G.Z., Han J.X., Entwisle C., Ang C.-S., Colaco C.A., McNulty S., Sutton P. Heat shock protein complex vaccination induces protection against *Helicobacter pylori* without exogenous adjuvant. *Vaccine*, 2014, vol. 32, pp. 2350–2358. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.02.051
7. Chmiela M., Michetti P. Inflammation, immunity, vaccines for *Helicobacter* Infection. *Helicobacter*, 2006, vol. 11, suppl. 1, pp. 21–26. doi: 10.1111/j.1478-405X.2006.00422.x
8. Choudhari S.P., Pendleton K.P., Ramsey J.D., Blanchard T.G., Picking W.D. A systematic approach toward stabilization of CagL, a protein antigen from *Helicobacter pylori* that is a candidate subunit vaccine. *J. Pharm. Sci.*, 2013, vol. 102, pp. 2508–2519. doi: 10.1002/jps.23643
9. Czinn S.J., Nedrud J.G. Oral immunization against *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.*, 1991, vol. 59 (7), pp. 359–363.
10. D'Elios M.M., Andersen L.P. *Helicobacter pylori* inflammation, immunity and vaccines. *Helicobacter*, 2007, vol. 12, suppl. 1, pp. 15–19. doi: 10.1111/j.1523-5378.2007.00530.x
11. D'Elios M.M., Czinn S.J. Immunity, inflammation, and vaccines for *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 2014, vol. 19, pp. 19–26. doi: 10.1111/hel.12156
12. Del Giudice G., Covacci A., Telford J.L., Montecucco C., Rappuoli R. The design of vaccines against *Helicobacter pylori* and their development. *Annu. Rev. Immunol.*, 2001, vol. 19, pp. 523–563. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.523
13. DeLyria E.S., Redline R.W., Blanchard T.G. Vaccination of mice against *H. pylori* induces a strong Th-17 response and immunity that is neutrophil dependent. *Gastroenterology*, 2009, vol. 136, pp. 247–256. doi: 10.1053/j.gastro.2008.09.017
14. Doidge C., Gust I., Lee A., Buck F., Hazell S., Manne U. Therapeutic immunisation against *Helicobacter* infection. *Lancet*, 1994, vol. 343, pp. 914–915
15. Ferrero R.L., Thiberge J.M., Kansau I., Wuscher N., Huerre M., Labigne A. The GroES homolog of *Helicobacter pylori* confers protective immunity against mucosal infection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, vol. 92, pp. 6499–6503.
16. Ghiara P., Marchetti M., Arico B., Burrone D., Figura N., Rappuoli R. Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science*, 1995, vol. 267 (5204), pp. 1655–1658.
17. Giudice G.D., Malferttheiner P., Rappuoli R. Development of vaccines against *Helicobacter pylori*. *Expert Rev. Vac.*, 2009, vol. 8 (8), pp. 1037–1049. doi: 10.1586/erv.09.62
18. Graham D.Y., Opekun A.R., Osato M.S., El-Zimaity H.M.T., Lee C.K., Yamaoka Y., Qureshi W.A., Cadoz M., Monath T.P. Challenge model for *Helicobacter pylori* infection in human volunteers. *Gut*, 2004, vol. 53, pp. 1235–1243. doi: 10.1136/gut.2003.037499
19. Hatzifoti C., Roussel Y., Harris A.G., Wren B.W., Morrow J.W., Bajaj-Elliott M. Mucosal immunization with a urease B DNA vaccine induces innate and cellular immune responses against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 2006, vol. 2, pp. 113–122. doi: 10.1111/j.1523-5378.2006.00385.x
20. Ilver D., Arnqvist A., Ogren J., Frick I.-M., Kersulyte D., Incecik E.T., Berg D.E., Covacci A., Engstrand L., Boren T. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science*, 1998, vol. 279, pp. 373–377. doi: 10.1126/science.279.5349.373
21. Kleanthous H., Myers G., Georgakopoulos K., Tibbitts T., Ingrassia J.W., Gray H., Ding R., Zhang Z.-Z., Lei W., Nichols R., Lee C.K., Ermak T.H., Monath T.P. Rectal and intranasal immunizations with recombinant urease induce distinct local and serum immune responses in mice and protect against *Helicobacter pylori* infection. *Infect. Immun.*, 1998, vol. 66 (6), pp. 2879–2886.
22. Kolesnikow T., Radcli V.F.J., Hazell S.L., Doidge C., Lee A. *Helicobacter pylori* catalase: a novel antigen for vaccination. *Gut*, 1996, vol. 39 (suppl.), p. A46.

23. Kotloff K.L., Sztein M.B., Wasserman S.S., Losonsky G.A., DiLorenzo S.C., Walker R.I. Safety and immunogenicity of oral inactivated whole-cell *Helicobacter pylori* vaccine with adjuvant among volunteers with or without subclinical infection. *Infect. Immun.*, 2001, vol. 69 (6), pp. 3581–3590. doi: 10.1128/IAI.69.6.3581-3590.2001
24. Kozlowski P.A., Cu-Uvin S., Neutra M., Flanigan T.P. Comparison of the oral, rectal, and vaginal immunization routes for induction of antibodies in rectal and genital tract secretions of women. *Infect. Immun.*, 1997, vol. 65, pp. 1387–1394
25. Lee M.H., Roussel Y., Wilks M., Tabaqchali S. Expression of *Helicobacter pylori* urease subunit B gene in *Lactococcus lactis* MG1363 and its use as a vaccine delivery system against *H. pylori* infection in mice. *Vaccine*, 2001, vol. 19, iss. 28–29, pp. 3927–3935.
26. Malfertheiner P., Megraud F., O’Morain C.A., Gisbert J.P., Kuipers E.J., Axon A.T., Bazzoli F., Gasbarrini A., Atherton J., Graham D.Y., Hunt R., Moayyedi P., Rokkas T., Rugge M., Selgrad M., Suerbaum S., Sugano K., El-Omar E.M. Management of *Helicobacter pylori* infection — the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut*, 2017, vol. 6, pp. 6–30. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312288
27. Malfertheiner P., Schultze V., Rosenkranz B., Kaufmann S.H.E., Ulrichs T., Novicki D., Norelli F., Contorni M., Peppoloni S., Berti D., Tornese D., Ganju J., Palla E., Rappuoli R., Scharschmidt B.F., Del Giudice G. Safety and immunogenicity of an intramuscular *Helicobacter pylori* vaccine in noninfected volunteers: a phase I study. *Gastroenterology*, 2008, vol. 135, pp. 787–795. doi: 10.1053/j.gastro.2008.05.054
28. Marchetti M., Arico B., Burroni D., Figura N., Rappuoli R., Ghiara P. Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science*, 1995, vol. 267, pp. 1655–1658.
29. Michetti Cuenca R., Blanchard T.G., Czinn S.J., Nedrud J.G., Monath T.P., Lee C.K., Redline R.W. Therapeutic immunization against *Helicobacter mustelae* in naturally infected ferrets. *Gastroenterology*, 1996, vol. 110, pp. 1770–1775.
30. Michetti P., Corthésy-Theulaz I., Davin C., Haas R., Vaney A.C., Heitz M., Bille J., Kraehenbuhl J.P., Saraga E., Blum A.L. Immunization of BALB/c mice against *Helicobacter felis* infection with *H. pylori* urease. *Gastroenterology*, 1994, vol. 107, pp. 1002–1011.
31. Michetti P., Kreiss C., Kotloff K.L., Porta N., Blanco J.L., Bachmann D., Herranz M., Saldinger P.F., Corthésy-Theulaz I., Losonsky G., Nichols R., Simon J., Stolte M., Ackerman S., Monath T.P., Blum A.L. Oral immunization with urease and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin is safe and immunogenic in *Helicobacter pylori*-infected adults. *Gastroenterology*, 1999, vol. 116 (4), pp. 804–812.
32. Mirzaei N., Poursina F., Moghim S., Rashidi N., Ghasemian Safaei H. The study of *H. pylori* putative candidate factors for single- and multi-component vaccine development. *Crit. Rev. Microbiol.*, 2017, vol. 43 (5), pp. 631–650. doi: 10.1080/1040841X.2017.1291578
33. Morihara F., Hifumi E., Yamada M., Nishizono A., Uda T. Therapeutic effects of molecularly designed antigen UREB138 for mice infected with *Helicobacter pylori*. *Biotechnol. Bioeng.*, 2008, vol. 100, pp. 634–643. doi: 10.1002/bit.21804
34. Nedrud J.G., Bagheri N., Schön K., Xin W., Bergroth H., Eliasson D.G., Lycke N.Y. Subcomponent vaccine based on CTA1-DD adjuvant with incorporated UreB class II peptides stimulates protective *Helicobacter pylori* immunity. *PLoS One*, 2013, vol. 8, pp. 1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0083321
35. Nystrom J., Raghavan S., Svennerholm A.M. Mucosal immune responses are related to reduction of bacterial colonization in the stomach after therapeutic *Helicobacter pylori* immunization in mice. *Microbes Infect.*, 2006, vol. 8, pp. 442–449. doi: 10.1016/j.micinf.2005.07.010
36. Ottsjö L.S., Flach C.F., Clements J., Holmgren J., Raghavan S. A double mutant heat-labile toxin from *Escherichia coli*, LT (R192G/L211A), is an effective mucosal adjuvant for vaccination against *Helicobacter pylori* infection. *Infect. Immun.*, 2013, vol. 81, pp. 1532–1540. doi: 10.1128/IAI.01407-12
37. Sanders C.J., Yu Y., Moore D.A., Williams I.R., Gewirtz A.T. Humoral immune response to flagellin requires T cells and activation of innate immunity. *J. Immunol.*, 2006, vol. 177, pp. 2810–2818.
38. Shi T., Liu W.Z., Gao F., Shi G., Xiao S. Intranasal CpG-oligodeoxynucleotide is a potent adjuvant of vaccine against *Helicobacter pylori*, and T helper 1 type response and interferon-gamma correlate with the protection. *Helicobacter*, 2005, vol. 10, pp. 71–79. doi: 10.1111/j.1523-5378.2005.00293.x
39. Smythies L.E., Novak M.J., Waites K.B., Lindsey J.R., Morrow C.D., Smith P.D. Poliovirus replicons encoding the B subunit of *Helicobacter pylori* urease protect mice against *H. pylori* infection. *Vaccine*, 2005, vol. 23, pp. 901–909. doi: 10.1016/j.vaccine.2004.07.037
40. Stadlander C.T., Gangemi J.D., Khanolvar S.S., Kitsos C.M., Farris H.E. Jr, Fulton L.K., Hill J.E., Huntington F.K., Lee C.K., Monath T.P. Immunogenicity and safety of recombinant *Helicobacter pylori* urease in a nonhuman primate. *Dig. Dis. Sci.*, 1996, vol. 41, pp. 1853–1862.
41. Sugano K., Tack J., Kuipers E.J., Graham D.Y., El-Omar E.M., Miura S., Haruma K., Asaka M., Uemura N., Malfertheiner P. Kyoto global consensus report on *Helicobacter pylori* gastritis. *Gut*, 2015, vol. 64, pp. 1–15. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309252
42. Sutton P., Doidge C., Pinczower G., Wilson J., Harbour S., Swierczak A., Lee A. Effectiveness of vaccination with recombinant HpaA from *Helicobacter pylori* is influenced by host genetic background. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2007, vol. 50, pp. 213–219. doi: 10.1111/j.1574-695X.2006.00206.x
43. Todoroki I., Joh T., Watanabe K., Miyashita M., Seno K., Nomura T., Ohara H., Yokoyama Y., Tochikubo K., Itoh M. Suppressing effects of DNA vaccines encoding heat shock protein on *Helicobacter pylori*-induced gastritis in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, vol. 277 (1), pp. 159–163. doi: 10.1006/bbrc.2000.3632
44. Velin D., Straubinger K., Gerhard M. Inflammation, immunity, and vaccines for *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 2016, vol. 21, pp. 26–29. doi: 10.1111/hel.12336
45. Vorobjova T., Chiba T.W.T. *Helicobacter pylori*. Immunology and vaccines. *Helicobacter*, 2008, vol. 13, suppl. 1, pp. 18–22. doi: 10.1111/j.1523-5378.2008.00636.x
46. Xu C., Li Z.S., Du Y.Q., Gong Y.F., Yang H., Sun B., Jin J. Construction of recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* DNA vaccine expressing *H. pylori* ureB and IL-2. *World J. Gastroenterol.*, 2007, vol. 13, pp. 939–944.

47. Zavala-Spinetti L., Breslin M.B., Correa H., Begue R.E. Development and evaluation of a DNA vaccine based on *Helicobacter pylori* urease B: failure to prevent experimental infection in the mouse model. *Helicobacter*, 2006, vol. 11, pp. 517–522. doi: 10.1111/j.1523-5378.2006.00453.x
48. Zeng M., Mao X.H., Li J.X., Tong W.D., Wang B., Zhang Y.J., Guo G., Zhao Z.J., Li L., Wu D.L., Lu D.S., Tan Z.M., Liang H.Y., Wu C., Li D.H., Luo P., Zeng H., Zhang W.J., Zhang J.Y., Guo B.T., Zhu F.C., Zou Q.M. Efficacy, safety, and immunogenicity of an oral recombinant *Helicobacter pylori* vaccine in children in China: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*, 2015, vol. 386 (10002), pp. 1457–1464. doi: 10.1016/S0140-6736(15)60310-5
49. Zhang H.X., Qiu Y.Y., Zhao Y.H., Liu X.T., Liu M., Yu A.L. Immunogenicity of oral vaccination with *Lactococcus lactis* derived vaccine candidate antigen (UreB) of *Helicobacter pylori* fused with the human interleukin 2 as adjuvant. *Mol. Cell. Probes*, 2014, vol. 28, pp. 25–30. doi: 10.1016/j.mcp.2013.08.003
50. Zhao W., Wu W., Xu X. Oral vaccination with liposome-encapsulated recombinant fusion peptide of urease B epitope and cholera toxin B subunit affords prophylactic and therapeutic effects against *H. pylori* infection in BALB/c mice. *Vaccine*, 2007, vol. 25, pp. 7664–7673. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.08.034

Авторы:

Успенский Ю.П., д.м.н., зав. кафедрой факультетской терапии им. профессора В.А. Вальдмана, ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры внутренних болезней стоматологического факультета, ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Барышникова Н.В., к.м.н., доцент кафедры внутренних болезней Стоматологического факультета, ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия; научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБУН Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Ермоленко Е.И., д.м.н., зав. лабораторией биомедицинской микроэкологии ФГБУН Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Суворов А.Н., член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, зав. кафедрой фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий факультета стоматологии и медицинских технологий СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия; зав. отделом молекулярной микробиологии, ФГБУН Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

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

Authors:

Uspenskiy Yu.P., PhD, MD (Medicine), Head of the Department of Professor V.A. Valdman Faculty Therapy, St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation; Professor, Department of Internal Medicine, Faculty of Dentistry, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Baryshnikova N.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Internal Diseases, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation; Researcher, Department of Molecular Microbiology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Ermolenko E.I., PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory of Biomedical Microecology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Suvorov A.N., RAS Corresponding Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Fundamental Problems of Medicine and Medical Technologies, Faculty of Dentistry and Medical Technologies, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation; Head of the Department of Molecular Microbiology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Svarval A.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory for Pathogens Identification, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 25.09.2018
Отправлена на доработку 18.03.2019
Принята к печати 26.03.2019

Received 25.09.2018
Revision received 18.03.2019
Accepted 26.03.2019

ЭНТЕРОВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ В СОЦИАЛИСТИЧЕСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ ВЬЕТНАМ

Л.Н. Голицына¹, Т.Т.Т. Нгуен², Н.И. Романенкова³, М.Т. Льюнг⁴, Л.Т. Ву⁵,
О.И. Канаева³, М.А. Бичурина³, Н.А. Новикова¹

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

² Институт Пастера в Хошимине, г. Хошимин, Вьетнам

³ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Российско-вьетнамский тропический научно-исследовательский и технологический центр, Южное отделение, г. Хошимин, Вьетнам

⁵ Российско-вьетнамский тропический научно-исследовательский и технологический центр, Головное отделение, Ханой, Вьетнам

Резюме. Энтеровирусные инфекции человека — это группа инфекционных заболеваний, вызываемых вирусами видов Enterovirus A–D (рода *Enterovirus* семейства *Picornaviridae*). Энтеровирусные инфекции могут различаться по клиническим проявлениям и тяжести течения: от бессимптомной инфекции до серьезных мульти-системных заболеваний. В процессе эволюции энтеровирусов могут формироваться штаммы с повышенной нейровирулентностью или атипичной патогенностью, обладающие при этом эпидемическим потенциалом. В недавнем прошлом по всему миру регистрировались вспышки энтеровирусной инфекции с повышенной частотой неврологических проявлений, значительной долей тяжелых случаев и летальных исходов, обусловленные энтеровирусами EV-A71, EV-D68 и другими. Всемирная организация здравоохранения включила энтеровирусную инфекцию, вызываемую вирусами EV-A71 и EV-D68, вместе с некоторыми другими опасными заболеваниями вирусной природы, в качестве кандидата для внесения в «Список приоритетных заболеваний». В связи с этим систематический глобальный надзор за циркуляцией энтеровирусов имеет значение для слежения за формированием и распространением эпидемических вариантов энтеровирусов, прогнозирования развития эпидемической ситуации, своевременного проведения профилактических мероприятий и разработки средств вакцинопрофилактики. Развитие сотрудничества России и Вьетнама в различных сферах деятельности приводит к увеличению миграции населения в обоих направлениях, что актуализирует научное и практическое взаимодействие в сфере надзора и борьбы с распространением инфекционных заболеваний, включая энтеровирусную инфекцию. В настоящее время эпидемиологический надзор за энтеровирусной инфекцией во Вьетнаме основан на мониторинге заболеваемости энтеровирусной экзантемой полости рта и конечностей, лабораторной диагностике энтеровирусной инфекции и идентификации штаммов энтеровирусов, выявляемых преимущественно у больных с тяжелым течением заболевания. У больных в 2001–2016 гг. были выявлены неполиомиелитные вирусы 34 типов. Наибольшую долю среди возбудителей составили вирусы EV-A71, CVA6, CVA10, CVA16. Самая высокая заболеваемость энтеровирусной инфекцией и наибольшее количество летальных случаев были связаны с ростом активности вируса EV-A71. В разные

Адрес для переписки:

Голицына Людмила Николаевна
603950, Россия, Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71,
ФБУН Нижегородский НИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной.
Тел.: 8 (831) 469-79-11 (служебн.). Факс: 8 (831) 469-79-20.
E-mail: lyudmila_galitzina@mail.ru

Contacts:

Liudmila N. Golitsyna
603950, Russian Federation, Nizhny Novgorod, Malaya Yamskaya, 71,
Blokina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology
and Microbiology.
Phone: +7 (831) 469-79-11 (office). Fax: +7 (831) 469-79-20.
E-mail: lyudmila_galitzina@mail.ru

Библиографическое описание:

Голицына Л.Н., Нгуен Т.Т.Т., Романенкова Н.И., Льюнг М.Т., Ву Л.Т.,
Канаева О.И., Бичурина М.А., Новикова Н.А. Энтеровирусная инфекция
в Социалистической Республике Вьетнам // Инфекция и иммунитет.
2019. Т. 9, № 3–4. С. 467–475. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-467-475

Citation:

Golitsyna L.N., Nguyen T.T.T., Romanenkova N.I., Luong M.T., Vo L.T.,
Kanaeva O.I., Bichurina M.A., Novikova N.A. Enterovirus infection in the
Socialist Republic of Vietnam // Russian Journal of Infection and Immunity =
Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 3–4, pp. 467–475. doi: 10.15789/2220-
7619-2019-3-4-467-475

временные периоды на территории Вьетнама была зафиксирована циркуляция EV-A71 генотипов C1, C4, C5 и B5. В последние годы доминирующим возбудителем энтеровирусной инфекции во Вьетнаме так же, как и в большинстве других стран, является вирус CVA6 нового пандемического генотипа. Результаты изучения филогенетических взаимоотношений штаммов вирусов EV-A71 и CVA6 из Вьетнама позволили установить факты множественных заносов эпидемических вариантов этих вирусов с сопредельных территорий. Последующее широкое распространение таких вариантов вирусов внутри страны обусловило развитие эпидемии энтеровирусной инфекции в 2011–2012 гг. и сохранение заболеваемости вирусной экзантемой полости рта и конечностей на высоком уровне до настоящего времени.

Ключевые слова: энтеровирусная инфекция, энтеровирусы, циркуляция, детекция, филогенетический анализ.

ENTEROVIRUS INFECTION IN THE SOCIALIST REPUBLIC OF VIETNAM

Golitsyna L.N.^a, Nguyen T.T.T.^b, Romanenkova N.I.^c, Luong M.T.^d, Vo L.T.^e, Kanaeva O.I.^c, Bichurina M.A.^c, Novikova N.A.^a

^a *Blokhina Nizhny Novgorod Research institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation*

^b *Pasteur Institute of Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh City, Viet Nam*

^c *St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation*

^d *Russian-Vietnamese Tropical research and technology center, South branch, Ho Chi Minh City, Viet Nam*

^e *Russian-Vietnamese Tropical research and technology center, Head office, Hanoi, Viet Nam*

Abstract. Human enterovirus infections comprise a group of infectious diseases caused by viruses of Enterovirus A-D species (genus *Enterovirus*, family *Picornaviridae*). Enterovirus infections can vary in clinical manifestations and severity, from asymptomatic infection to serious multisystem diseases. During evolution, enterovirus strains with increased neurovirulence or atypical pathogenicity may emerge exhibiting an epidemic potential. Recently, outbreaks of enterovirus infection with an increased rate of neurological manifestations, a significant percentage of severe cases and lethal outcomes have been observed worldwide, which were associated with enteroviruses EV-A71, EV-D68 etc. The World Health Organization has included EV-A71 and EV-D68 enterovirus infection together with some other dangerous viral diseases considered for inclusion in the List of Blueprint Priority Diseases. In connection with this, global enterovirus surveillance is important for controlling emergence and spread of epidemic enterovirus variants, prediction of establishing epidemic situation, timely conduction of preventive measures and vaccine development. A growing multi-field cooperation between Russia and Vietnam leads to increased two-way population migration, which actualizes scientific and practical collaboration in surveillance and control of infectious disease spread, including enterovirus infection. Currently, epidemiological surveillance of enterovirus infection in Vietnam is based on monitoring hand, foot and mouth disease (HFMD) rate, laboratory diagnostics of enterovirus infection and identification of enterovirus strains, mainly detected in severe patients. In 2001–2016, 34 non-polio virus types were identified in patients with enterovirus infection, largely represented by viruses EV-A71, CVA6, CVA10, and CVA16. Moreover, the peak incidence of enterovirus infection and related mortality rate were associated with the increased activity of EV-A71 virus. In Vietnam, EVA71 enterovirus of genotypes C1, C4, C5 and B5 circulated at different times. Over the last years, a new pandemic genotype virus CVA6 has been dominating as a causative agent of enterovirus infection in Vietnam as well as the majority of other countries. The data on phylogenetic relation between Vietnamese epidemic EV-A71 and CVA6 strains allowed to find that they underwent multiple between-country spreads, whereas their subsequent in-country dissemination resulted in 2011–2012 enterovirus outbreak and sustained high-level HFMD morbidity.

Key words: enterovirus infection, enterovirus, circulation, detection, phylogenetic analysis.

Введение

Энтеровирусные инфекции человека — это группа инфекционных заболеваний, вызываемых вирусами видов Enterovirus A-D (EV-A-D, более ста представителей) рода *Enterovirus* семейства *Picornaviridae* [39].

Энтеровирусные инфекции (ЭВИ) могут различаться по клиническим проявлениям и тяжести течения: от бессимптомной инфекции или легких лихорадочных состояний до серьезных мультисистемных заболеваний, сопровождающихся поражением сердечно-сосудис-

той и центральной нервной систем. Благодаря особенностям молекулярной организации энтеровирусов в процессе их эволюции могут формироваться штаммы с повышенной нейровирулентностью или нетипичной патогенностью, обладающие при этом эпидемическим потенциалом. В последние годы в Европейских странах, в том числе и в России, регулярно происходят вспышки асептического менингита, чаще всего вызываемого вирусом ЕСНО 30 [2, 5, 8]. Начиная с 2008 г., в мире распространяются атипичные формы инфекции, обусловленные вирусом Коксаки А6 (CV-A6), протекаю-

шие с необычными кожными проявлениями [29]. В недавнем прошлом по всему миру регистрировались вспышки, связанные с энтеровирусами EV-A71, EV-D68 и др. Эти вспышки привлекли внимание специалистов в связи с повышенной частотой неврологических проявлений, значительной долей тяжелых случаев и летальных исходов [18, 19]. Наряду с самым опасным заболеванием энтеровирусной природы — полиомиелитом, Программа искоренения которого вступила в завершающую фазу, распространение энтеровирусной инфекции, связанной с формированием вариантов непوليوмиелитных энтеровирусов с повышенной нейровирулентностью, считается серьезной глобальной угрозой. В 2018 г. Всемирная организация здравоохранения включила энтеровирусную (неполиомиелитную) инфекцию, вызываемую EV-A71 и EV-D68, вместе с ареновирусными геморрагическими лихорадками (кроме лихорадки Ласса), лихорадкой чикунгунья; коронавирусными заболеваниями (отличными от MERS и SARS) и тяжелой лихорадкой с синдромом тромбоцитопении (SFTS), в качестве кандидата для внесения в «Список приоритетных заболеваний» [38].

В связи с вышесказанным, систематическое глобальное наблюдение за циркуляцией энтеровирусов, анализ спектра и установление особенностей смены типов, генотипов возбудителей энтеровирусных инфекций имеет значение для слежения за формированием и распространением эпидемических вариантов энтеровирусов. Это, в свою очередь, важно для прогнозирования развития эпидемической ситуации в том или ином регионе, своевременного проведения профилактических мероприятий и разработки средств вакцинопрофилактики.

Развитие сотрудничества России и Вьетнама в различных сферах деятельности приводит к увеличению миграции населения в обоих направлениях. В связи с этим становится актуальным научное и практическое взаимодействие в сфере надзора и борьбы с распространением инфекционных заболеваний, включая энтеровирусные инфекции.

Заболееваемость энтеровирусной инфекцией в Социалистической Республике Вьетнам

Как упоминалось, наибольшую опасность для здоровья человека представляют энтеровирусные инфекции, сопровождающиеся неврологическими осложнениями. До 1997 г. ведущей причиной вирусных заболеваний центральной нервной системы во Вьетнаме являлся вирус японского энцефалита. Со вре-

мени включения вакцины против японского энцефалита в Расширенную программу иммунизации в Азии (Южная Корея, Китай, Бангладеш и Непал) в 1997 г. произошло значительное уменьшение доли японского энцефалита в структуре нейроинфекций. Во Вьетнаме, где охват иммунизацией к 2008 г. достиг 91%, доля японского энцефалита среди госпитализированных пациентов снизилась с 50% в 1996 г. до 10% в 2009 г. [27, 30]. В последнее десятилетие в число ведущих этиологических агентов тяжелых неврологических заболеваний вирусной природы во Вьетнаме вошли вирус денге и энтеровирусы [30]. Это связано не только с уменьшением доли японского энцефалита в структуре нейроинфекций на фоне вакцинации, но и с ростом заболеваемости лихорадкой денге и ЭВИ во многих странах Юго-Восточной Азии, включая Вьетнам.

В настоящее время эпидемиологический надзор за ЭВИ во Вьетнаме основан на мониторинге заболеваемости энтеровирусной экзантемой полости рта и конечностей — hand, foot and mouth disease (HFMD, код по МКБ 10 — B08.4).

Первые случаи HFMD во Вьетнаме были зарегистрированы в 2003 г. в г. Хошимин во время вспышки острого энцефалита, связанного с HFMD. Результаты первого эпидемиологического и вирусологического исследования этого энтеровирусного заболевания были опубликованы Phan Van Tu с соавт. в 2007 г. [28]. В ходе изучения вспышки в Южном Вьетнаме в 2005 г. было обследовано 764 ребенка в возрасте до 15 лет (96% — до 5 лет), госпитализированных в детскую больницу в г. Хошимине в 2005г. Энтеровирусы были выявлены более, чем в половине случаев (54%). При этом EV-A71 составил 42%, а CA16 — 52% от всех идентифицированных энтеровирусов. У 51 (29%) пациента с инфекцией, связанной с EV-A71, заболевание сопровождалось тяжелыми неврологическими осложнениями, а 3 случая закончились летальным исходом [28]. В период 2006–2007 гг. в этот же стационар было госпитализировано 305 больных с неврологическими заболеваниями, у 36 (11%) из которых была диагностирована инфекция, вызванная энтеровирусом EV-A71, три человека умерло [36]. По данным, опубликованным в разных источниках, динамику заболеваемости и смертности от HFMD в целом по Вьетнаму можно проследить с 2007 по 2018 г. (рис. 1) [21, 25, 26, 36, 37].

Резкий рост заболеваемости HFMD произошел во Вьетнаме в 2011 г., когда был зарегистрирован 113 121 случай заболевания, из них 170 с летальным исходом [21]. В Южном Вьетнаме эпидемический подъем заболеваемости начался в мае, пик пришелся на сентябрь. В детскую больницу Хошимина в период с 18 сентября

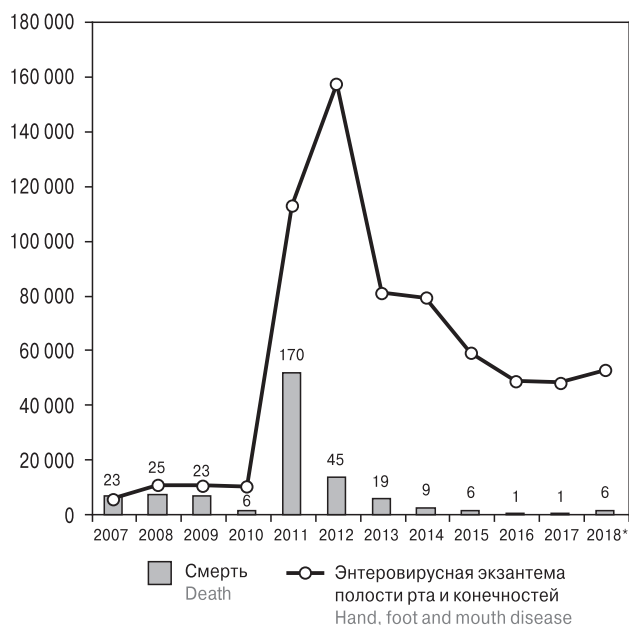


Рисунок 1. Динамика заболеваемости HFMD во Вьетнаме в 2007–2018 гг.

Figure 1. The dynamics of the HFMD incidence in Vietnam in 2007–2018

Примечание. *Данные за первые 9 месяцев 2018 г.
Note. *Data for the first 9 months of 2018

по 30 ноября 2011 г. с симптомами HFMD был госпитализирован 3791 ребенок (95% детей было в возрасте 1–4 года, средний возраст пациентов — 20 месяцев, 62% — мальчики). Тяжелое течение заболевания наблюдалось у 443 (12%) пациентов, 6 детей умерло. Среди ЭВ, выявленных у пациентов с тяжелыми формами, 76% составил EV-A71 типа, вирус CA16 выявлен не был [16]. В Центральный госпиталь провинции Дак Лак в 2011 г. было госпитализировано 744 пациента с HFMD. Доля тяжелых случаев составила 8,5%, один больной умер. Так же как и в Хошимине, средний возраст пациентов составил 20 месяцев, 93,4% случаев пришлось на группу детей до 3 лет. Энтеровирус EV-A71 был выявлен у 63% «тяжелых» пациентов с положительным результатом тестирования на ЭВ [35]. Заболеваемость и смертельные случаи, связанные с HFMD, в 2011 г. регистрировались во всех частях Вьетнама, однако наибольшая доля как заболевших, так и умерших пришлось на южные провинции; в 2012 г. эпидемия распространилась на северную часть. В среднем по Вьетнаму в 2011 г. летальность при заболевании энтеровирусной экзантемой полости рта и конечностей составила 1,5 на 1000 зарегистрированных случаев [21]. В 2011 г. Министерство Здравоохранения Социалистической Республики Вьетнам (СРВ) классифицировало HFMD как тяжелое инфекционное заболевание (инфекционные заболевания класса В) с высоким

эпидемическим потенциалом и включило его в перечень инфекционных заболеваний, подлежащих еженедельной отчетности [21].

В 2013–2017 гг. число больных и умерших от HFMD во Вьетнаме значительно снизилось, однако уровень заболеваемости оставался значительно выше, чем до эпидемии. В 2018 г. вновь наблюдался рост заболеваемости и смертности [25].

В 2012 г. в Южном Вьетнаме была создана система надзора за энтеровирусной экзантемой полости рта и конечностей и, в частности за инфекцией, вызываемой вирусом EV-A71, в основу которой легло обязательное лабораторное обследование тяжелых и летальных случаев ЭВИ и изучение выделенных штаммов энтеровирусов [24]. Алгоритм молекулярно-генетических и вирусологических исследований, проводимых при выявлении энтеровирусов у больных с клиникой HFMD и идентификации типа/генотипа вируса, представлен на рисунке 2. В то же время в ряде научных публикаций представлены результаты исследований по детекции энтеровирусов у больных с респираторными заболеваниями и нейроинфекциями [7, 10, 11, 20, 30, 32].

Этиологические агенты

энтеровирусной инфекции во Вьетнаме

Суммируя данные по идентификации энтеровирусов, опубликованные разными исследовательскими центрами [6, 7, 15, 22, 24, 34], можно констатировать, что в период 1997–2016 гг. во Вьетнаме у больных с различными формами ЭВИ были выявлены неполиомиелитные вирусы 4 видов, не менее 36 типов: Enterovirus A: Коксаки A2 (CVA2), CVA4, CVA5, CVA6, CVA8, CVA10, CVA12, CVA14, CVA16, EV-A71, EV-A90; Enterovirus B: CVA9, Коксаки B1 (CVB1), CVB2, CVB3, CVB4, CVB5, ECHO3 (E3), E4, E5, E6, E7, E9, E11, E12, E13, E16, E18, E19, E24, E25, E27, E30; Enterovirus C: CVA24, EV-C96; Enterovirus D: EV-D68.

У больных энтеровирусной экзантемой полости рта и конечностей наиболее часто были обнаружены вирусы EV-A71, CA16, CA6, CA10, реже — вирусы CA2, CA4, CA5, CA8, CA12 и другие вирусы вида Enterovirus A, редко — вирусы вида Enterovirus B [6, 7, 15, 24]. У больных с заболеваниями центральной нервной системы (преимущественно менингиты и энцефалиты) вместе с энтеровирусом EV-A71 часто выявлялись энтеровирусы E30, E4 и другие представители вида Enterovirus B. У пациентов с респираторными формами ЭВИ чаще других энтеровирусов обнаруживался EV-D68 [7, 22].

Поскольку эпидемиологический надзор за ЭВИ во Вьетнаме основан на мониторинге заболеваемости энтеровирусной экзантемой

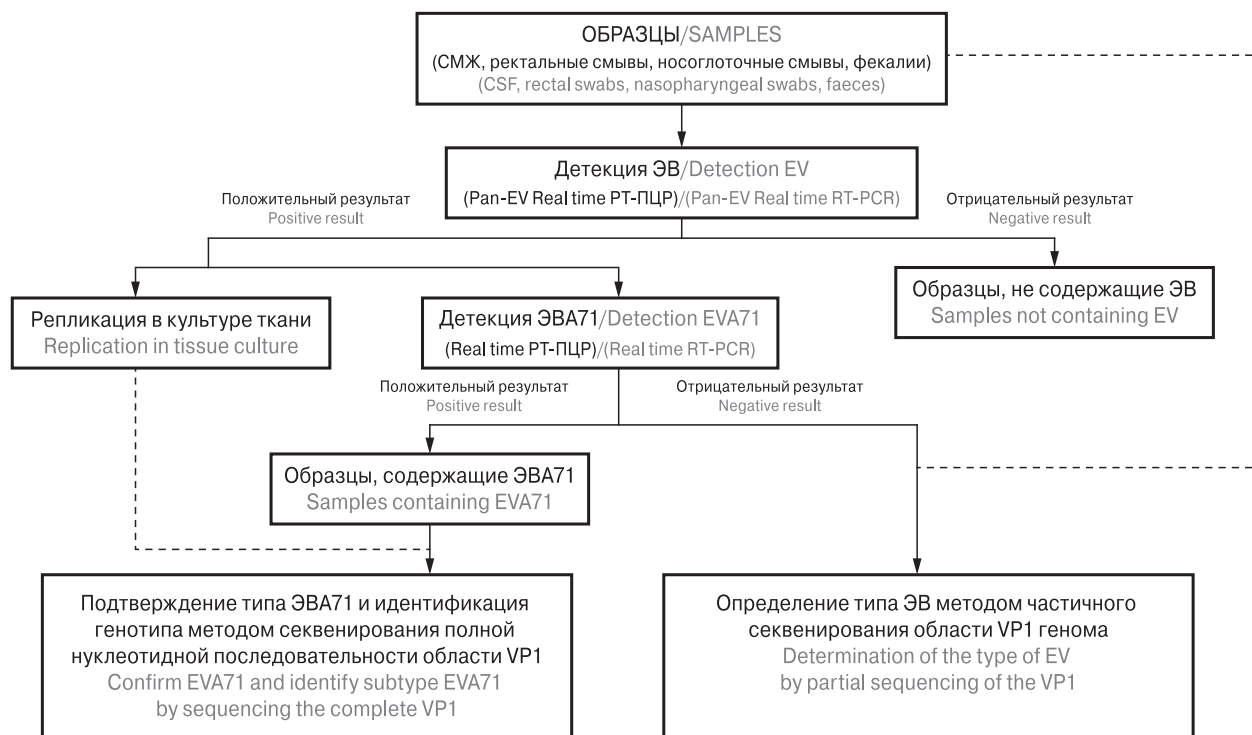


Рисунок 2. Алгоритм лабораторных исследований на энтеровирусы материала от больных HFMD
Figure 2. Laboratory algorithm for Enteroviruses from HFMD patients

полости рта и конечностей, наиболее полно охарактеризован спектр и свойства основных возбудителей этой клинической формы ЭВИ. До 2011 г. в этиологической структуре HFMD преобладали вирусы EV-A71 и CVA16 [28, 36]. Во время эпидемии HFMD в 2011 г. частота обнаружения вируса CVA16 у больных резко снизилась. Так в Хошимине осенью 2011 г. при обследовании 174 детей с HFMD вирус EV-A71 был обнаружен в 76% случаев, вирус CVA16 не выявлялся [16]. В 2012 г. во Вьетнаме, так же как и во многих других странах, был отмечен рост активности вируса CVA6. Частота обнаружения этого вируса у больных, госпитализированных в Хошимине, возросла с 6% в 2011 г. до 13% — в 2012 г., 18% — в 2013 г., 32% — в 2014 г., 29% — в 2015 г. При обследовании этой же группы пациентов в среднем за период 2011–2015 гг. вирус EV-A71 был выявлен в 36% случаев, CVA16 — в 10%, CVA-10 — в 7% [6]. От амбулаторных больных HFMD в Хошимине в 2013–2015 гг. вирус CVA6 также стал выделяться чаще остальных энтеровирусов [15]. Подобная смена основных возбудителей энтеровирусных экзантемных заболеваний с доминированием вируса CVA6 в последнее десятилетие наблюдалась и в других странах, включая РФ [1, 3, 4, 29].

Наибольшее число тяжелых форм ЭВИ и летальных исходов во Вьетнаме было связано с вирусом EV-A71 [15, 16, 21, 35]. В 2011 г. инфекция, обусловленная EV-A71, была лабораторно под-

тверждена в 82% случаев ЭВИ, закончившихся летальным исходом [21]. Помимо EV-A71 при расследовании летальных случаев (нейроинфекции, неонатальный сепсис) были выявлены вирусы CVB1, CVB5, E24, E25 [7].

Молекулярно-генетическая характеристика доминирующих типов неполиомиелитных энтеровирусов

Энтеровирус А71

Впервые во Вьетнаме энтеровирус EV-A71 был выявлен в Институте Пастера (Хошимин) при обследовании больных энцефалитом, госпитализированных во время вспышки энтеровирусной экзантемы полости рта и конечностей в 2003 г. в южных провинциях [28]. В настоящее время в международных базах данных опубликовано более тысячи (1004) нуклеотидных последовательностей области VP1 генома, кодирующего этот полипротеин, или полного генома штаммов вируса EV-A71, циркулировавшего во Вьетнаме в 2003–2016 гг. В этот период была зафиксирована циркуляция энтеровируса EV-A71 генотипов C1, C4, C5 и B5 [12, 13, 16, 17, 23, 28, 31, 33]. В 2003–2010 гг. в структуре генотипов вирусов EV-A71 преобладал генотип C5. Штаммы вируса EV-A71 генотипов C1 и C4 выявлялись редко: C1 — в 2005 г., C4 — в 2004–2006 гг. [23, 28]. В 2011 г. произошла смена доми-

нирующего генотипа EV-A71 с C5 на C4. Рост заболеваемости HFMD во Вьетнаме с увеличением числа случаев с летальным исходом наблюдался в 2011–2012 гг. — на пике активности циркуляции вируса EV-A71 генотипа C4 [12, 13, 15, 16, 17, 23, 25]. В 2011 г. на территории Вьетнама было зафиксировано начало циркуляции вируса EV-A71 генотипа B5, который в 2013 г. стал доминирующим [12, 23]. Установлено, что в период доминирования штаммов вируса EV-A71 генотипа B5 в 2013–2017 гг. значительно снизилась летальность при инфекции, вызванной вирусом EV-A71. Следует отметить, что за 9 месяцев 2018 г. одновременно с возобновлением активности циркуляции вирусов EV-A71 генотипа C4, отмеченном как в Южном, так и в Северном Вьетнаме, был зафиксирован рост заболеваемости HFMD и увеличение количества случаев с тяжелыми неврологическими проявлениями и летальным исходом [9, 25]. В сравнительном аспекте интересно отметить, что пик активности циркуляции энтеровируса EV-A71 в России, наблюдавшийся в 2013 г., был также связан с заносом и распространением вируса генотипа C4 [2].

При изучении филогеографии EV-A71 было установлено, что вирусы EV-A71 генотипов C1, C4 и B5 были в разное время импортированы на территорию Вьетнама [13, 23]. При этом в отношении вирусов EV-A71 генотипов C4 и B5 прослеживаются множественные заносы из сопредельных государств Юго-Восточной Азии и Тихоокеанского региона с последующим распространением и длительной циркуляцией этих вирусов внутри страны. Появление вируса EV-A71 генотипа C1, родственного европейским штаммам, по-видимому, явилось следствием единичного заноса, поскольку этот вирус выявлялся только в 2005 г. локально (г. Хошимин) и не получил широкого распространения. Вирус EV-A71 генотипа C5 проявил свойства эндемичного варианта. Циркуляция этого вируса в период 2003–2013 гг. наблюдалась ежегодно. За пределами Вьетнама штаммы этого варианта выявлялись эпизодически, по-видимому, вследствие единичных заносов из эндемичной зоны [23].

Энтеровирус Коксаки А6

Начиная с 2014 г. ведущим возбудителем энтеровирусной экзантемы полости рта и конечностей в большинстве регионов мира становится вирус CVA6. Увеличение доли инфекции, вызванной вирусом CVA6, в структуре энтеровирусной инфекции связано с формированием в середине первого десятилетия XXI в. нового генотипа этого вируса, получившего пандемическое распространение и вытеснившего из циркуляции вирусы «старых» генотипов, ко-

торые циркулировали в предыдущие годы [29]. Во Вьетнаме циркуляция вируса CVA6 пандемического генотипа фиксируется, начиная с 2011 г., а с 2012 г. этот вирус становится ведущим этиологическим агентом энтеровирусной экзантемы полости рта и конечностей. В результате филогенетического анализа последовательностей генома 100 штаммов вируса CVA6, выделенных от больных HFMD, госпитализированных в стационары Хошимина в 2011–2015 гг., было показано их родство со штаммами из других стран Юго-Восточной Азии и установлен временной интервал заноса эндемического варианта на территорию Вьетнама в 2010 г. [6].

Энтеровирус D68

С момента открытия его в 1962 г. энтеровирус EV-D68 выявлялся как при вспышках, так и при спорадической заболеваемости респираторными инфекциями. Внимание к этому возбудителю возросло, когда в 2014 г. в США увеличилось число случаев острых вялых параличей, предположительно этиологически связанных с этим вирусом [14, 19]. В целях изучения циркуляции EV-D68 во Вьетнаме было исследовано 5863 образца от пациентов с респираторными и неврологическими заболеваниями, собранных в 2009–2015 гг., включая материал от 624 пациентов с положительным результатом тестирования на энтеровирусы и риновирусы [22]. EV-D68 был обнаружен у 21 лица, что составило 3,4% от числа пациентов с энтеровирусной или риновирусной инфекцией и 0,4% от всех обследованных. У всех пациентов инфекция проявлялась в виде легкого респираторного заболевания. При проведении филогенетического анализа было выявлено несколько генетических вариантов вьетнамских штаммов EV-D68, относящихся к генотипам B1 и A2, что свидетельствовало о нескольких заносах этого вируса на территорию страны. Все вьетнамские штаммы вируса EV-D68 имели близкое генетическое родство со штаммами из Азии и значительно отличались от вирусов этого типа, выделенных в США и Европе от больных с острыми вялыми параличами [22]. Результаты проведенного исследования указывали на то, что уровень циркуляции энтеровируса EV-D68 во Вьетнаме в указанный промежуток времени был невысок и, по-видимому, не повлиял на рост заболеваемости тяжелыми формами ЭВИ.

Заключение

Таким образом, в настоящее время эпидемиологический надзор за энтеровирусной инфекцией во Вьетнаме основан на мониторинге заболеваемости энтеровирусной экзантемой

полости рта и конечностей, лабораторной диагностике энтеровирусной инфекции, и идентификации штаммов энтеровирусов, выявляемых преимущественно у больных с тяжелым течением заболевания. У больных энтеровирусной инфекцией в 2001–2016 гг. были выявлены непوليوмиелитные вирусы 36 типов. Наибольшую долю среди возбудителей составили вирусы EV-A71, CVA6, CVA10, CVA16. Самая высокая заболеваемость энтеровирусной инфекцией и наибольшее количество летальных случаев были связаны с ростом активности энтеровируса EV-A71. В разные временные периоды на территории Вьетнама была зафиксирована циркуляция вирусов EV-A71 генотипов C1, C4, C5 и B5. В последние несколько лет домини-

рующим возбудителем энтеровирусной экзантемы полости рта и конечностей во Вьетнаме, так же как и в большинстве других стран, является вирус CVA6 нового пандемического генотипа. В результате изучения филогенетических взаимоотношений вьетнамских штаммов вирусов EV-A71 и CVA6 были установлены множественные заносы эпидемических вариантов этих вирусов с сопредельных территорий. Последующее широкое распространение таких вариантов энтеровирусов внутри страны обусловило развитие эпидемии энтеровирусной инфекции в 2011–2012 гг. и поддержание заболеваемости энтеровирусной экзантемы полости рта и конечностей на высоком уровне до настоящего времени.

Список литературы/References

- Голицына Л.Н., Зверев В.В., Парфенова О.В., Епифанова Н.В., Сашина Т.В., Кашников А.Ю., Григорьева Г.И., Новикова Н.А. Вирус Коксаки А6 в Российской Федерации в 2014 году // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2015. № 28. С. 12–20. [Golitsyna L.N., Zverev V.V., Parfenova O.V., Epifanova N.V., Sashina T.A., Kashnikov A.Yu., Grigor'eva G.I., Novikova N.A. Coxsackievirus A6 in Russian Federation in 2014. *Dal'nevostochnyy zhurnal infektsionnoy patologii = The Far Eastern Journal of Infectious Pathology*, 2015, no. 285, pp. 12–20. (In Russ.)]
- Голицына Л.Н., Зверев В.В., Парфенова О.В., Новикова Н.А. Эпидемические варианты непوليوмиелитных энтеровирусов в России // Медицинский альманах. 2015. Т. 40, № 5. С. 136–140. [Golitsyna L.N., Zverev V.V., Parfenova O.V., Novikova N.A. Epidemic variants of non-poliomyelitic enteroviruses in Russia. *Meditsinskiy al'manakh = Medical Almanac*, 2015, vol. 40, no. 5, pp. 136–140. (In Russ.)]
- Лукашев А.Н., Голицына Л.Н., Вакуленко Ю.А., Ахмадишина Л.В., Романенкова Н.И., Сапега Е.Ю., Морозова Н.С., Новикова Н.А., Троценко О.Е., Иванова О.Е. Современные возможности и направления развития молекулярно-эпидемиологического мониторинга в надзоре за энтеровирусными инфекциями. Опыт Российской Федерации // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 4. С. 452–464. [Lukashov A.N., Golitsina L.N., Vakulenko Y.A., Akhmadishina L.V., Romanenkova N.I., Sapega E.Yu., Morozova N.S., Novikova N.A., Trotsenko O.E., Ivanova O.E. Current possibilities and potential development of molecular enterovirus surveillance. Experience of the Russian Federation. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2018, vol. 8, no. 4, pp. 452–464. doi: 10.15789/2220-7619-2018-4-452-464 (In Russ.)]
- Романенкова Н.И., Голицына Л.Н., Бичурина М.А., Розаева Н.Р., Канаева О.И., Зверев В.В., Созонов Д.В., Черкасская И.В., Кириллова Л.П., Ермакова М.В., Камынина Л.С., Петухова М.Б., Грицай А.Б., Новикова Н.А. Заболеваемость энтеровирусной инфекцией и особенности циркуляции непوليوмиелитных энтеровирусов на некоторых территориях России в 2017 году // Журнал инфектологии. 2018. Т. 10, № 4. С. 124–133. [Romanenkova N.I., Golitsyna L.N., Bichurina M.A., Rozaeva N.R., Kanaeva O.I., Zverev V.V., Sozonov D.V., Cherkasskaya I.V., Kirillova L.P., Ermakova M.V., Kamynina L.S., Petukhova M.B., Gritsay A.B., Novikova N.A. Enterovirus infection morbidity and peculiarities of nonpolio enteroviruses circulation on some territories of Russia in 2017. *Zhurnal infekologii = Journal Infectology*, 2018, vol. 10, no. 4, pp. 124–133. doi: 10.22625/2072-6732-2018-10-4-124-133 (In Russ.)]
- Шишко Л.А., Романенкова Н.И., Бичурина М.А., Гордиенко Т.А., Розаева Н.Р., Голицына Л.Н., Фомина С.Г., Канаева О.И., Лялина Л.В., Новикова Н.А. Этиология сезонных подъемов заболеваемости энтеровирусной инфекцией в Архангельской области // Инфекция и иммунитет. 2013. Т. 3, № 1. С. 65–72. [Shishko L.A., Romanenkova N.I., Bichurina M.A., Gordienko T.A., Rozaeva N.R., Golitsina L.N., Fomina L.B., Kanaeva O.I., Lialina L.V., Novikova N.A. Etiology of seasonal increasing of enteroviral infection in Arkhangelsk oblast. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2013, vol. 3, no. 1, pp. 65–72. doi: 10.15789/2220-7619-2013-1-65-72 (In Russ.)]
- Anh N.T., Nhu L.N.T., Van H.M.T., Hong N.T.T., Thanh T.T., Hang V.T.T., Ny N.T.H., Nguyet L.A., Phuong T.T.L., Nhan L.N.T., Hung N.T., Khanh T.H., Tuan H.M., Viet H.L., Nam N.T., Viet D.C., Qui P.T., Wills B., Sabanathan S., Chau N.V.V., Thwaites L., van Doorn H.R., Thwaites G., Rabaa M.A., Van Tan L. Emerging Coxsackievirus A6 causing hand, foot and mouth disease, Vietnam. *Emerg. Infect. Dis.*, 2018, vol. 24, no. 4, pp. 654–662. doi: 10.3201/eid2404.171298
- B'Krong N.T.T.C., Minh N.N.Q., Qui P.T., Chau T.T.H., Nghia H.D.T., Do L.A.H., Nhung N.N., van Vinh Chau N., Thwaites G., van Tan L., van Doorn H.R., Thanh T.T. Enterovirus serotypes in patients with central nervous system and respiratory infections in Viet Nam 1997–2010. *Virol. J.*, 2018, vol. 15, no. 69, pp. 1–8. doi: 10.1186/s12985-018-0980-0
- Broberg E.K., Simone B., Jansa J., The EU/EEA Member State Contributors. Upsurge in echovirus 30 detections in five EU/EEA countries, April to September, 2018. *Euro Surveill.*, 2018, vol. 23, no. 44. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.44.1800537
- Dao T.H.N., Nguyen T.A., Nguyen T.H.T., Tran N.D., Ngu D.N., Tran N.T., Tran T.N.H. Re-emergence of enterovirus 71 subgroup C4a associated with hand foot and mouth disease in northern provinces, Vietnam, 2016–2018. *Vietnam J. Prevent. Med.*, 2018, vol. 28, no. 7, p. 115.
- Do A.H., van Doorn H.R., Nghiem M.N., Bryant J.E., Hoang T.H., Do Q.H., Van T.L., Tran T.T., Wills B., Nguyen V.C., Vo M.H., Vo C.K., Nguyen M.D., Farrar J., Tran T.H., de Jong M.D. Viral etiologies of acute respiratory infections among hospitalized Vietnamese children in Ho Chi Minh City, 2004–2008. *PLoS One*, 2011, vol. 6, no. 3: e18176. doi: 10.1371/journal.pone.0018176

11. Do L.A., Bryant J.E., Tran A.T., Nguyen B.H., Tran T.T., Tran Q.H., Vo Q.B., Tran Dac N.A., Trinh H.N., Nguyen T.T., Le Binh B.T., Le K., Nguyen M.T., Thai Q.T., Vo T.V., Ngo N.Q., Dang T.K., Cao N.H., Tran T.V., Ho L.V., Farrar J., de Jong M., van Doorn H.R. Respiratory syncytial virus and other viral infections among children under two years old in Southern Vietnam 2009–2010: clinical characteristics and disease severity. *PLoS One*, 2016, vol. 11, no. 8: e0160606. doi: 10.1371/journal.pone.0160606
12. Donato C., Le T.H., Nguen T.H., Tran M.H., Le V.D., Ta T.D.N., Nguen V.K., Nguen V.T., Vijaykrishna D. Genetic characterization of Enterovirus 71 strains circulating in Vietnam in 2012. *Virology*, 2016, vol. 495, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.virol.2016.04.026
13. Geoghegan J.L., Tan le V., Kühnert D., Halpin R.A., Lin X., Simenauer A., Akopov A., Das S.R., Stockwell T.B., Shrivastava S., Ngoc N.M., Uyen le T.T., Tuyen N.T., Thanh T.T., Hang V.T., Qui P.T., Hung N.T., Khanh T.H., Thinh le Q., Nhan le N.T., Van H.M., Viet do C., Tuan H.M., Viet H.L., Hien T.T., Chau N.V., Thwaites G., Grenfell B.T., Stadler T., Wentworth D.E., Holmes E.C., Van Doorn H.R. Phylodynamics of Enterovirus A71-associated hand, foot, and mouth disease in Viet Nam. *J. Virol.*, 2015, vol. 89, no. 17, pp. 8871–8879. doi: 10.1128/JVI.00706-15
14. Greninger A.L., Naccache S.N., Messacar K., Clayton A., Yu G., Somasekar S., Federman S., Stryke D., Anderson C., Yagi S., Messenger S., Wadford D., Xia D., Watt J.P., Van Haren K., Dominguez S.R., Glaser C., Aldrovandi G., Chiu C.Y. A novel outbreak enterovirus D68 strain associated with acute flaccid myelitis cases in the USA (2012–14): a retrospective cohort study. *Lancet Infect. Dis.*, 2015, vol. 15, no. 6, pp. 671–682. doi: 10.1016/S1473-3099(15)70093-9
15. Hoang M.T.V., Nguyen T.A., Tran T.T., Vu T.T.H., Le N.T.N., Nguyen T.H.N., Le T.H.N., Nguyen T.T.H., Nguyen T.H., Le N.T.N., Truong H.K., Du T.Q., Ha M.T., Ho L.V., Do C.V., Nguyen T.N., Nguyen T.M.T., Sabanathan S., Phan T.Q., Nguyen Van V.C., Thwaites G.E., Wills B., Thwaites C.L., Le V.T., van Doorn H.R. Clinical and aetiological study of hand, foot and mouth disease in southern Vietnam, 2013–2015: inpatients and outpatients. *Int. J. Infect. Dis.*, 2019, vol. 80, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.ijid.2018.12.000
16. Khanh T.H., Sabanathan S., Thanh T.T., Thoa le P.K., Thuong T.C., Hang Vt., Farrar J., Hien T.T., van Vinh Chau N., van Doorn H.R. Enterovirus 71-associated hand, foot, and mouth disease, Southern Vietnam, 2011. *Emerg. Infect. Dis.*, 2012, vol. 18, no. 12, pp. 2002–2005. doi: 10.3201/eid1812.120929
17. Le T.V., Nguyen V.T.T., Nguyen Q.H., Pham D.T. Molecular epidemiology analysis of enterovirus 71 strains isolated in Dak Lak, Vietnam, 2011–2016. *J. Med. Virol.*, 2019, vol. 91, pp. 56–64. doi: 10.1002/jmv.25286
18. Lugo D., Krogstad P. Enteroviruses in the early 21st century: new manifestations and challenges. *Curr. Opin. Pediatr.*, 2016, vol. 28, no. 1, pp. 107–113. doi: 10.1097/MOP.0000000000000303
19. Messacar K., Schreiner T.L., Maloney J.A., Wallace A., Ludke J., Oberste M.S., Nix W.A., Robinson C.C., Glodé M.P., Abzug M.J., Dominguez S.R. A cluster of acute flaccid paralysis and cranial nerve dysfunction temporally associated with an outbreak of enterovirus D68 in children in Colorado, USA. *Lancet*, 2015, vol. 385, pp. 1662–1671. doi: 10.1016/S0140-6736(14)62457-0
20. Nguyen D.N.T., Mai L.Q., Bryant J.E., Hang N.L.K., Hoa L.N.M., Nadjm B., Thai P.Q., Duong T.N., Anh D.D., Horby P., van Doorn H.R., Wertheim H.F.L., Fox A. Epidemiology and etiology of influenza-like-illness in households in Vietnam; it's not all about the kids! *J. Clin. Virol.*, 2016, vol. 82, pp. 126–132. doi: 10.1016/j.jcv.2016.07.014
21. Nguyen N.T., Pham H.V., Hoang C.Q., Nguyen T.M., Nguyen L.T., Phan H.C., Phan L.T., Vu L.N., Tran Minh N.N. Epidemiological and clinical characteristics of children who died from hand, foot and mouth disease in Vietnam, 2011. *BMC Infect. Dis.*, 2014, vol. 14, no. 341, pp. 1–7. doi: 10.1186/1471-2334-14-341
22. Nguen T.H.N., Anh N.T., Hang V.T.T., Nguyet L.A., Thanh T.T., Ha D.Q., Minh N.N.Q., Ha D.L.A., McBride A., Tuan H.M., Baker S., Tam P.T.T., Phuc T.M., Huong D.T., Loi T.Q., Vu N.T.A., Hung N.V., Minh T.T.T., Xang N.V., Dong N., Nghia H.D.T., Chau N.V.V., Thwaites G., van Doorn H.R., Anscombe C., Le Van T.; VIZIONS Consortium. Enterovirus 68 in Vietnam (2009–2015). *Wellcome Open Res.*, 2017, vol. 2, no. 41, pp. 1–17. doi: 10.12688/wellcomeopenres.11558.2
23. Nguen T.T.T., Donato C., Trang V.T.H., Kien N.T., Trang P.M.M.T., Khanh T.Q., Nguyet D.T., Sessions O.M., Cuong H.Q., Lan P.T., Huong V.T.Q., van Doorn H.R., Vijaykrishna D. Evolution and spatiotemporal dynamics of enterovirus A71 subgenogroups in Vietnam. *J. Infect. Dis.*, 2017, vol. 216, no. 11, pp. 1371–1379. doi: 10.1093/infdis/jix500
24. Nguen T.T.T., Vu T.H.T., Nguen T.K., Pham M.T.T., Tran Q.K., Hoang Q.C. Circulation of Coxsackievirus A in hand-foot-mouth disease in Southern Vietnam 2015–2016. *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2018, vol. 8, no. 4, p. 533. doi:10.15789/2220-7619-2018-4-3.35
25. Nhan L.N.T., Hong N.T.T., Nhu L.N.T., Nguyet L.A., Ny N.T.H., Thanh T.T., Han D.D.K., Van H.M.T., Thwaites C.L., Hien T.T., Qui P.T., Quang P.V., Minh N.N.Q., van Doorn H.R., Khanh T.H., Chau N.V.V., Thwaites G., Hung N.T., Tan L.V. Severe enterovirus A71 associated hand, foot and mouth disease, Vietnam, 2018: preliminary report of an impending outbreak. *Euro Surveill.*, 2018, vol. 23, no. 46, pp. 1–5. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.46.1800590
26. Phan C.H., Nguyen T.P.T., Doan N.M.Q., Nguyen T.T.T., Nguyen Q.H., Tran A.T., Nguyen Q.K., Kiem S.H., Hoang T.L., Vu T.H.T., Nguyen T.K., Phan T.L. Epidemiological characteristic of hand, foot and mouth disease in the south of Vietnam, 2010–2012. Vietnam. *J. Prevent. Med.*, 2013, vol. 23, no. 10, p. 172.
27. Phan N.T., Gouilh M.A., Paireau J., Phuong L., Cheval J., Ngu N.D., Hébert C., Nguyen T.H., Lortholary O., Tondeur L., Manuguerra J.C., Barouki R., Sander J., Janzen N., Nguyen H.T., Brey P.T., Fontanet A., Eloit M. Hypoglycemic toxins and enteroviruses as causes of outbreaks of acute encephalitis-like syndrome in children, Bac Giang province, Northern Vietnam. *Emerg. Infect. Dis.*, 2018, vol. 24, no. 8, pp. 1435–1443. doi: 10.3201/eid2408.171004
28. Phan V.T., Nguen T.T.T., Perera D., Truong K.H., Tien N.T.K., Thuong T.C., How O.M., Cardoso M.J., McMinn P.C. Epidemiologic and virologic investigation of hand, foot, and mouth disease, southern Vietnam, 2005. *Emerg. Infect. Dis.*, 2007, vol. 13, no. 11, pp. 1733–1741. doi: 10.3201/eid1311.070632
29. Puenpa J., Vongpunasawad S., Österback R., Waris M., Eriksson E., Albert J., Midgley S., Fischer T.K., Eis-Hübinger A.M., Cabrerizo M., Gaunt E., Simmonds P., Poovorawan Y. Molecular epidemiology and the evolution of human coxsackievirus A6. *J. Gen. Virol.*, 2016, vol. 97, no. 12, pp. 3225–3231. doi: 10.1099/jgv.0.000619
30. Tan le V., Thai le H., Phu N.H., Nghia H.D., Chuong L.V., Sinh D.X., Phong N.D., Mai N.T., Man D.N., Hien V.M., Vinh N.T., Day J., Chau N.V., Hien T.T., Farrar J., de Jong M.D., Thwaites G., van Doorn H.R., Chau T.T. Viral aetiology of central nervous system infections in adults admitted to a tertiary referral hospital in southern Vietnam over 12 years. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2014, vol. 8, no. 8, pp. 1–11. doi: 10.1371/journal.pntd.0003127

31. Tan le V., Tuyen N.T., Thanh T.T., Ngan T.T., Van H.M., Sabanathan S., Van T.T., Thanh le T.M., Nguyet L.A., Geoghegan J.L., Ong K.C., Perera D., Hang V.T., Ny N.T., Anh N.T., Ha do Q., Qui P.T., Viet do C., Tuan H.M., Wong K.T., Holmes E.C., Chau N.V., Thwaites G., van Doorn H.R. A generic assay for whole-genome amplification and deep sequencing of enterovirus A71. *J. Virol. Meth.*, 2015, vol. 215–216, pp. 30–36. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.02.011
32. Taylor W.R., Nguyen K., Nguyen D., Nguyen H., Horby P., Nguyen H.L., Lien T., Tran G., Tran N., Nguyen H.M., Nguyen T., Nguyen H.H., Nguyen T., Tran G., Farrar J., de Jong M., Schultz C., Tran H., Nguyen D., Vu B., Le H., Dao T., Nguyen T., Wertheim H. The spectrum of central nervous system infections in an adult referral hospital in Hanoi, Vietnam. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 8, pp. 1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0042099
33. Thoa le P.K., Chiang P.S., Khanh T.H., Luo S.T., Dan T.N., Wang Y.F., Thuong T.C., Chung W.Y., Hung N.T., Wang J.R., Nhan le N.T., Thinh le Q., Su I.J., Dung T.D., Lee M.S. Genetic and antigenic characterization of enterovirus 71 in Ho Chi Minh City, Vietnam, 2011. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 7, pp. 1–6. doi: 10.1371/journal.pone.0069895
34. Tran T.N.H., Nguen T.A.D., Dao T.H.A., Nguen T.T.T., Vu M.H., Nguen T.H.T. Enteroviruses associated with hand foot and mouth disease in the North of Vietnam, 2015–2016. *Vietnam J. Prevent. Med.*, 2017, vol. 27, no. 8, p. 492.
35. Van Pham H., Hoang T.N.A., Duong H.T., Phan L.T., Phan U.T.N., Ho N.X., Hoang C.Q. Clinical characteristics of hand, foot and mouth disease in Daklak Province, Vietnam and associated factors of severe cases. *VirusDisease*, 2017, vol. 28, no. 4, pp. 430–433. doi: 10.1007/s13337-017-0402-8
36. World Health Organization. A guide to clinical management and public health response for hand, foot and mouth disease. 2011 [cited 29 March 2019]. URL: https://iris.wpro.who.int/bitstream/handle/10665.1/5521/9789290615255_eng.pdf
37. World Health Organization. Disease surveillance – archives. Hand, Foot and Mouth Disease [cited 29 March 2019]. URL: <https://www.who.int/westernpacific/emergencies/surveillance/archives>
38. World Health Organization. List of Blueprint Priority Diseases. February 2018 — Second Annual Review [cited 29 March 2019]. URL: <https://www.who.int/blueprint/priority-diseases/en>
39. Zell R., Delwart E., Gorbalenya A.E., Hovi T., King A.M.Q., Knowles N.J., Lindberg A.M., Pallansch M.A., Palmenberg A.C., Reuter G., Simmonds P., Skern T., Stanway G., Yamashita T. and ICTV Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. *J. Gen. Virol.*, 2017, vol. 98, no. 10, pp. 2421–2422. doi: 10.1099/jgv.0.000911

Авторы:

Голицына Л.Н., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия;

Нгуен Т.Т.Т., к.м.н., зав. лабораторией энтеровирусов отдела иммунологии и микробиологии Института Пастера в Хошимине, г. Хошимин, Вьетнам;

Романенкова Н.И., к.м.н., старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник лаборатории этиологии и контроля вирусных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Льонг М.Т., к.х.н., зав. лабораторией тропической биомедицины Российско-Вьетнамского Тропического научно-исследовательского и технологического центра, Южное отделение, г. Хошимин, Вьетнам;

Ву Л.Т., к.б.н., зам. зав. лабораторией фармации, Российско-Вьетнамский Тропический научно-исследовательский и технологический центр, Головное отделение, Ханой, Вьетнам;

Канаева О.И., научный сотрудник лаборатории этиологии и контроля вирусных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

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

Новикова Н.А., д.б.н., профессор, зав. лабораторией молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия.

Authors:

Golitsyna L.N., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Epidemiology of Viral Infections, Blokhina Nizhny Novgorod Research institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Nguyen T.T.T., PhD (Medicine), Head of the Laboratory of Enteroviruses, Department of Immunology and Microbiology, Pasteur Institute of Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh City, Viet Nam;

Romanenkova N.I., PhD (Medicine), Senior Researcher, Leading Researcher Laboratory of Etiology and Control of Viral Infections St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Luong M.T., PhD (Chemistry), Head of the Laboratory Tropical Biomedicine, Russian-Vietnamese Tropical Research and Technology Center, South Branch, Ho Chi Minh City, Viet Nam;

Voe L.T., PhD (Biology), Deputy Head of Pharmacy Laboratory, Russian-Vietnamese Tropical Research and Technology Center, Head Office, Hanoi, Viet Nam;

Kanaeva O.I., Researcher, Laboratory of Etiology and Control of Viral Infections St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

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

Novikova N.A., PhD, MD (Biology), Professor, Head of the Laboratory of Molecular Epidemiology of Viral Infections, Blokhina Nizhny Novgorod Research institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation.

ПОДАВЛЕНИЕ ЦИКЛА ВИРУСА ГЕПАТИТА В ПОД ДЕЙСТВИЕМ НУКЛЕОЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ CRISPR/Cas9 И БЕЛКА HBx

С.А. Брезгин^{1,2}, А.П. Костюшева¹, В.Н. Смирский³, Е.В. Волчкова⁴,
Д.С. Чистяков⁴, Д.С. Костюшев¹, В.П. Чуланов^{1,4}

¹ ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

² ФГБУ ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия

³ Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

⁴ ГБОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия

Резюме. Вирус гепатита В (ВГВ) может вызывать хронический гепатит В (ХГВ) — тяжелое хроническое заболевание печени инфекционной природы. По последним данным официального статистического наблюдения, число больных ХГВ в мире превышает 250 млн человек, а в Российской Федерации составляет около 3 млн человек. Противовирусные препараты (аналоги нуклеоз(т)идов и пегилированный интерферон) подавляют репликацию и транскрипцию вируса, однако не способны полностью элиминировать его из организма. Причиной этого является стабильная форма генома ВГВ — кольцевая ковалентно замкнутая ДНК (ккзДНК), которая представляет из себя компактную минихромосому, экранированную от воздействия противовирусных препаратов. Необходимым шагом для излечения ХГВ является разработка новых терапевтических подходов, направленных на разрушение или инактивацию матриц ккзДНК. Системы сайт-специфических нуклеаз CRISPR/Cas9 способны вносить двуцепочечные разрывы в практически любые заданные участки ДНК. Ранние работы по использованию сайт-специфических нуклеаз CRISPR/Cas9 для ВГВ продемонстрировали эффективное разрезание ккзДНК, однако деградации всех матриц добиться не удалось. Вероятно, причиной этого являются структурные особенности ккзДНК, которая может существовать в гетерохроматизированном состоянии, недоступном для действия белков-нуклеаз CRISPR/Cas9. Один из активаторов транскрипции, вирусный белок HBx, способен релаксировать структуру ккзДНК, привлекая к ним факторы, ремоделирующие хроматин. Белок HBx активирует транскрипцию ВГВ и способствует расплетению структуры ккзДНК, делая ее более доступной для систем CRISPR/Cas9. В данной работе было изучено влияние белка HBx дикого типа, а также мутантных, более безопасных форм HBx белка (HBxMut, который не взаимодействует с факторами Vcl-2 и Vcl-xL, и HBxNESM, который не вызывает образование активных форм кислорода и не индуцирует двуцепочечные разрывы в геноме) на эффективность систем CRISPR/Cas9. Выяснилось, что HBx белок и его мутантные формы способны значительно увеличить эффективность систем CRISPR/Cas9, подавляя транскрипцию вирусной прегеномной РНК вплоть до 98%. Были определены оптимальные соотношения и концентрации плазмид, кодирующих элементы систем CRISPR/Cas9 и белков HBx. Кроме того, было показано, что белки HBx в выбранном диапазоне концентраций не вы-

Адрес для переписки:

Костюшева Анастасия Павловна
111123, Россия, Москва, ул. Новогиреевская, 3А,
ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора.
Тел.: 8 925 310-91-24 (моб.).
E-mail: ak@rcvh.ru

Contacts:

Anastasiya P. Kostyusheva
111123, Russian Federation, Moscow, Novogireevskaya str., 3A,
Central Research Institute of Epidemiology.
Phone: +7 925 310-91-24 (mobile).
E-mail: ak@rcvh.ru

Библиографическое описание:

Брезгин С.А., Костюшева А.П., Смирский В.Н., Волчкова Е.В.,
Чистяков Д.С., Костюшев Д.С., Чуланов В.П. Подавление цикла вируса
гепатита В под действием нуклеолитических систем CRISPR/Cas9
и белка HBx // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 3–4. С. 476–484.
doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-476-484

Citation:

Brezgin S.A., Kostyusheva A.P., Simirsky V.N.c, Volchkova E.V.,
Chistyakov D.S., Kostyushev D.S., Chulanov V.P. Suppression of hepatitis B
virus by a combined activity of CRISPR/Cas9 and HBx proteins // Russian
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9,
no. 3–4, pp. 476–484. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-476-484

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 16-15-10426.

зывают изменений пролиферации и жизнеспособности клеток. Таким образом, совместное действие систем сайт-специфических нуклеаз CRISPR/Cas9 и вирусного белка-активатора HBx значительно подавляет транскрипцию вируса гепатита В.

Ключевые слова: вирус гепатита В, кольцевая ковалентно замкнутая ДНК, CRISPR/Cas9, белок HBx, мутантные формы белка HBx.

SUPPRESSION OF HEPATITIS B VIRUS BY A COMBINED ACTIVITY OF CRISPR/Cas9 AND HBx PROTEINS

Brezgin S.A.^{a,b}, Kostyusheva A.P.^a, Simirsky V.N.^c, Volchkova E.V.^d, Chistyakov D.S.^d, Kostyushev D.S.^a, Chulanov V.P.^{a,d}

^a Central Research Institute of Epidemiology, Rospotrebnadzor, Moscow, Russian Federation

^b Institute of Immunology FMBA, Moscow, Russian Federation

^c Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

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

Abstract. Chronic hepatitis B is a severe liver disease associated with persistent infection with hepatitis B virus. According to recent estimations, 250 million people in the world are chronically infected, including 3 million chronically infected people in Russia. Antiviral therapeutics (nucleos(t)ide analogues and PEGylated interferon) suppress viral transcription and replication, but do not eliminate the virus from infected cells. The key reason for HBV persistency is a stable form of the viral genome (covalently closed circular DNA, cccDNA) that exists as a minichromosome protected from novel cccDNA-targeting therapeutics. Novel therapeutic approaches aimed at elimination or inactivation of cccDNA are urgently needed. CRISPR/Cas9 systems induce double strand breaks in target sites of DNA sequences. Experiments with CRISPR/Cas9 demonstrated high antiviral activity and efficient cleavage of cccDNA, but a small part of cccDNA pool remains intact. One of the main reasons of incomplete cccDNA elimination might be the structural organization of cccDNA, which persists in a heterochromatinized, very compacted form and is not be accessible to CRISPR/Cas9 systems. Viral protein HBx unwinds cccDNA and regulates cccDNA epigenetically by recruiting transcription-remodeling factors. In this work, we analyzed effects of CRISPR/Cas9 in combination with an HBx-encoding plasmid or plasmids encoding mutant forms of HBx (HBxMut, which does not interact with pro-apoptotic factors Bcl-2 и Bcl-xL, and HBxNesm is localized exclusively in the nucleus and does not generate reactive oxygen species and double strand breaks in the genome). We showed that HBx improves CRISPR/Cas9 efficiency, decreasing pregenomic RNA transcription level over 98%. Moreover, we analyzed optimal ratios of plasmids encoding CRISPR/Cas9 and HBx proteins for better antiviral efficacy. Furthermore, we discovered that HBx proteins do not have an effect on proliferation and viability of the transfected cells. In conclusion, CRISPR/Cas9 with HBx proteins exhibit high antiviral effect.

Key words: hepatitis B virus, circular covalently closed DNA, CRISPR/Cas9, specificity, HBx protein, mutant forms of HBx protein.

Введение

Инфекция вирусом гепатита В (ВГВ) может протекать в острой или хронической формах, на сегодняшний день около 250 млн людей страдают от хронического гепатита В (ХГВ) [20]. Для лечения пациентов с ХГВ используются аналоги нуклеоз(т)идов либо пегилированная форма интерферона, однако они способны лишь подавлять вирусный цикл, при этом не оказывая прямого воздействия на основную причину хронической инфекции — персистирующую в ядрах гепатоцитов кольцевую ковалентно замкнутую ДНК (ккзДНК) ВГВ [10, 11]. В отличие от короткоживущих транскриптов вируса и репликативных интермедиатов (двухцепочечной линейной и кольцевой частично двухцепочечной ДНК) ккзДНК в покоящихся гепатоцитах может находиться в течение очень длительного времени, при этом она является

недостижимой для действия любых современных противовирусных средств даже в ходе продолжительных (от нескольких лет до десятилетий) курсов терапии [1]. Воздействие на транскрипционно-активную часть пула ккзДНК в гепатоцитах, которая составляет только некоторую часть популяции ккзДНК [16], отмечено лишь при лечении препаратами интерферона- α и несколькими цитокинами, которое заключается в снижении транскрипции ккзДНК и ее частичной элиминации в результате активации молекулярных внутриклеточных механизмов иммунитета и эпигенетического ремоделирования [17]. Следовательно, требуется разработка эффективного подхода, который позволит достичь деградации ккзДНК *per se* или сделать ее функционально некомпетентной. Технология сайт-специфических нуклеаз CRISPR/Cas9 является одной из немногих технологий, способных оказывать прямое воздействие на ккзДНК. В ранее

опубликованных работах было продемонстрировано значительное подавление вирусной инфекции и снижение уровней ккзДНК вплоть до 90%. Тем не менее добиться нуклеолитического расщепления всех матриц ккзДНК системами CRISPR/Cas9 пока не удалось [5, 11, 14, 15, 16]. Причиной этого могут быть особенности структуры ккзДНК, которая остается недоступной для действия нуклеаз, поскольку она имеет нуклеосомную организацию и ассоциирована с гистоновыми и негистоновыми белками [13]. Она формирует в ядре типичную структуру «бусин на нитке» и существует в виде минихромосомы. Вирусный белок НВс в структуре минихромосомы связывается с двуцепочечной ДНК вируса, что приводит к уменьшению расстояния между нуклеопротеиновыми комплексами на 10% [3]. Таким образом, ккзДНК является высокостабильной структурой и может быть экранирована от действия CRISPR/Cas9 гистоновыми и негистоновыми белками. Считается, что ккзДНК может существовать в нескольких конформациях, которые определяют ее транскрипционную активность [12, 16]. КкзДНК, существующая в транскрипционно активной конформации, может быть более доступна для действия CRISPR/Cas9. Таким образом, перевод матриц ккзДНК в транскрипционно активное состояние может увеличить эффективность нуклеолитического расщепления системами CRISPR/Cas9. Известно, что вирусный белок НВх регулирует ккзДНК эпигенетически и усиливает экспрессию вирусных РНК [2]. Он обеспечивает эпигенетический контроль ккзДНК, регулируя взаимодействие хроматин-ремоделирующих белков с ДНК вируса. В клетках с мутантной формой НВх белка пул ккзДНК в ядре не уменьшается, однако количество транскрибируемой прегеномной РНК снижается значительно. Взаимодействие НВх с ккзДНК связано с процессами вирусной репликации и привлечения ацетилтрансфераз p300 и СВР. НВх связывает многие клеточные белки, включая компоненты транскрипционного комплекса (RPB5, TFIIВ, ТВР, TFIIН), коактиваторы (СВР, p300, и РСАФ) и факторы транскрипции (ATF/CREB, ATF3, с/ЕВР, NF-IL-6, Ets, Egr, SMAD4, Oct1, RXR receptor, p53) [2]. Таким образом, НВх является главным активатором транскрипции вируса, способствуя релаксации структуры ккзДНК и привлечению белков, обеспечивающих процесс инициации транскрипции.

В ходе данной работы был проведен анализ действия систем CRISPR/Cas9 в комбинации с белками НВх дикого типа [4], белком НВхMut [8], не взаимодействующим с проапоптотическими факторами Bcl-2 и Bcl-xL, и НВхNESM [6], у которого отсутствует сигнал экспорта из ядра, также он не вызывает образо-

вание активных форм кислорода в цитоплазме и не индуцирует двуцепочечные разрывы в геноме человека. Были подобраны оптимальные условия котрансфекции клеток HepG2 плазмидами, кодирующими элементы систем CRISPR/Cas9, и плазмидами, кодирующими белки НВх. Выяснилось, что все 3 изученных белка могут значительно увеличивать эффект CRISPR/Cas9 систем с рядом РНК-проводников, что выражается в снижении уровня транскриптов прегеномной РНК ВГВ. Помимо этого, трансфекция плазмидами, кодирующими белки НВх, не вызвала значительных изменений пролиферации и жизнеспособности клеток.

Материалы и методы

Линии клеток. Клетки гепатомы человека HepG2 культивировали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л) (Thermo Fisher Scientific), 1% фетальной бычьей сыворотки (Gibco), 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 2 мМ L-глутамин при 37°C (5% CO₂). Клетки в 24- и 12-луночных планшетах, достигшие 60–70% плотности, трансфицировали: 1) плазмидой, кодирующей геном ВГВ (HBV-1.1mer, предоставлена Dieter Glebe, Университет Гиссена); 2) плазмидой, кодирующей белок Cas9 (предоставлена Phil Sharp и Feng Zhang, Addgene plasmid #63592); 3) ПЦР-продуктом, кодирующим РНК-проводник под U6-промотором (плаزمид для получения ПЦР-продукта предоставлена Eric Lander и David Sabatini, Addgene plasmid #50662); 4) одной из плазмид, кодирующей соответствующий белок НВх (НВх дикого типа, предоставлена Wang-Shick Ryu, Addgene plasmid #65463, НВхMut, предоставлена Ding Xue, Addgene plasmid #42598, НВхNESM, предоставлена Xin Wang, Addgene plasmid #, пустая плаزمид НВх, синтезирована в нашей лаборатории при помощи вырезания кодирующего НВх участка из плазмиды #65463) с помощью PEI. Через 24 ч среду отбирали, клетки промывали дважды фосфатным буфером, меняли среду на полную и инкубировали в течение еще 48 ч. После чего выделялись нуклеиновые кислоты и производился анализ ПЦР в реальном времени.

Дизайн РНК-проводников и получение ПЦР-продуктов. Мишени в геноме ВГВ были подобраны с использованием сервиса Broad Institute Genetic Perturbation Platform (portals.broadinstitute.org) и программы Geneious 7.1.9. ПЦР-продукт с U6-промотором, кодирующий РНК-проводник, получали при помощи двухэтапного мутагенного ПЦР с высокоточной полимеразой Q5 (New England Biolabs), с проведением амплификации с плазмиды pLX-sgRNA (Addgene plasmid #50662). РНК-проводник содержит мишень в геноме ВГВ и шпильку, необходимую для распознавания

белком *S. pyogenes* Cas9. Были подобраны следующие последовательности РНК-проводников:

Sp1: AGAGTGAGAGGCCTGTATTT;
 Sp2: CTGCACGTTCGATGGAGACC;
 Sp3: ACTGTTCAAGCCTCCAAGCT;
 Sp4: CTCCTTATCGTCAATCTTC;
 Sp5: ATGGGCCATCAGCGCATGCG;
 Sp6: ACTACTGTTGTTAGACGACG;
 Sp7: CACCTCACCACTGCACTC;
 Sp8: GGTTCACCCACCGCACGG;
 Sp9: AATGTCAACGACCGACCTTG;
 Sp10: GTCTGTGCCTTCTCATCTGC;
 Sp11: GCGTTGATGCCTTTGTATGC;
 Sp12: AGTGTGCTGACGCAACCC;
 Sp13: CCTATCGTCAATCTTCTCG;
 Sp14: CTTCCACCAGCAATCCTCT;
 Sp15: CCACTGGCTGGGGCTTGGTC;
 Sp16: CACTGTTGGCTTTCAGTTA;
 Sp17: CACCGCACGGAGGCCTTTTG;
 Sp18: GGTCTGTGCCAAGTGTTTGC;
 Sp19: CTGCCGATCCATACTGCGGA;
 Sp20: TCTCATCTGCCGGACCGTGT;
 Sp21: TTATAAAGAATTTGGAGCTA;
 Sp22: TCGCCTCGCAGACGAAGGTC;
 Sp23: CTGGGTTTCACCCACCGCA;
 Sp24: TGTGCACTTCGCTTCACCTC;
 Sp25: TCTCGTGTTACAGGCGGGGT.

Выделение нуклеиновых кислот. Выделение нуклеиновых кислот проводили с помощью набора AmpliSens «РИБО-преп» по протоколу производителя, добавляя лизирующий буфер непосредственно к клеткам после удаления среды и двукратного промывания фосфатным буфером. Фракцию нуклеиновых кислот обрабатывали ферментом DNase I по протоколу производителя в течение 30 мин при 37°C, после чего для инактивации фермента осуществлялось перевыделение РНК с помощью набора «АмплиПрайм РИБО-преп». Далее проводилась обратная транскрипция с помощью набора «Реверта-L».

Полуколичественный ПЦР-анализ. Полуколичественный ПЦР-анализ проводили со специфическими праймерами и зондами TaqMan на прегеномную РНК ВГВ (пгРНК) и GAPDH. Были использованы следующие последовательности праймеров:

для GAPDH:

– прямой:

CCAGGTGGTCTCCTCTGACTT;

– обратный:

GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT;

– зонд:

(fam) GAGCTACACTTGGCTGTGCT (bhq1);

для прегеномной РНК:

– прямой:

GGTCCCCTAGAAGAAGAACTCCCT;

– обратный:

CATTGAGATTCGCGAGATTGAGAT;

– зонд:

(fam) TCTCAATCGCCGCGTTCGAGCA (bhq1).

Иммуноцитохимический анализ. Для иммуноцитохимического окрашивания клетки выращивались на стеклах. Перед помещением в культуру стекла были простерилизованы: обработаны 70% этанолом и выдержаны под ультрафиолетом в течение часа. Далее стекла помещались на дно 6-луночных планшетов, клетки высевали с плотностью $0,5 \times 10^5$ на лунку. Фиксация клеток проводилась следующим образом: среда изымалась, клетки промывались дважды фосфатным буфером, фиксировались 4% параформальдегидом в течение 10 мин, отмывались трижды в Tris-HCl буфере (1x, 50 мМ, pH = 8,0) по 10 мин. Tris-HCl отбирали, клетки обрабатывали блокирующим буфером в течение 30 мин. Стекла обрабатывали первичными антителами (разведение антител 1:1000) к НВхAg в блокирующем буфере в течение 1 ч, производили отмывку несвязавшихся антител с помощью отмывочного буфера (3 раза по 10 мин). Стекла обрабатывали вторичными антителами (разведение антител 1:300) в блокирующем буфере течение часа, снова промывали отмывочным буфером (3 раза по 10 мин). Для визуализации ядер клетки инкубировались с красителем Hoechst33342 в течение 10 мин и заключались в среде Fluoroshield.

Микроскопирование. Микроскопирование проводили на флуоресцентном микроскопе Leica DM16000 с иммерсионными линзами, при 20- и 100-кратном увеличении. Полученные изображения анализировались с помощью программы Leica AF. Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП ИБР им. Н.К. Кольцова РАН.

Анализ пролиферации и жизнеспособности методом колориметрии. Исследование динамики пролиферации клеток HepG2 и их жизнеспособности проводили с помощью набора Cell Cytotoxicity Assay kit (Abcam Biochemicals), который предназначен для оценки пролиферации и жизнеспособности клеток по запатентованной технологии восстановления флуоресцентного субстрата делящимися клетками, по протоколу производителя. Эксперименты проводили в 96-луночных планшетах, рассеивая клетки с 30%-ной плотностью в 8 технических повторах; для детекции флуоресцентного сигнала использовали планшетный спектрофотометр iMark (Bio-Rad Laboratories, Inc., США).

Статистика. Статистическую обработку проводили с помощью t-критерия Стьюдента или однофакторного дисперсионного анализа OneWay ANOVA (где применимо) с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 7, попарные апостериорные сравнения производили с помощью критерия Тьюки.

Результаты

Усиление нуклеолитического действия CRISPR/Cas9 под действием белка HBx

Влияние HBx на эффективность противовирусного действия анализировали на модели котрансфекции клеток HepG2 по экспрессии прегеномной РНК. В клетки были котрансфицированы: 1) плаزمиды, кодирующая геном ВГВ; 2) плазмиды, кодирующая белок Cas9 *Streptococcus pyogenes*; 3) ПЦР-продукт, кодирующий соответствующий РНК-проводник; 4) плазмиды, кодирующая соответствующий белок HBx (либо некодирующая плаزمиды). Как и следовало ожидать, при трансфекции плазмиды HBx без РНК-проводников происходит значительная активация вирусного цикла: уровень прегеномной РНК возрастает в $6,12 \pm 1,02$ раз ($p > 0,001$) (рис. 1Б, II обложка). Далее была проведена первичная оценка влияния HBx дикого типа на действие систем CRISPR/Cas9. На рисунке 1А

(II обложка) представлена карта генома ВГВ с отмеченными на ней участками, к которым нацелены РНК-проводники. Все РНК-проводники были отобраны в предварительных экспериментах и сами по себе обладают высокой эффективностью действия (снижение уровня прегеномной РНК на 29–96%, $p > 0,0001$). Всего было проанализировано 25 РНК-проводников (Sp1–Sp25) для системы *S. pyogenes* Cas9 с котрансфекцией плазмиды HBx или пустой плазмиды. Противовирусное действие оценивали по уровню экспрессии транскрипта ВГВ — прегеномной РНК. Для 9 РНК-проводников котрансфекция HBx не вызвала никаких статистически достоверных изменений транскрипции прегеномной РНК (рис. 2Б), для 3 РНК-проводников наблюдалось снижение эффективности CRISPR/Cas9 на 9–42% (рис. 2В). Тем не менее для 13 РНК-проводников котрансфекция плазмидой HBx приводила к усилению противовирусного действия CRISPR/Cas9 на 2–42% (рис. 2А).

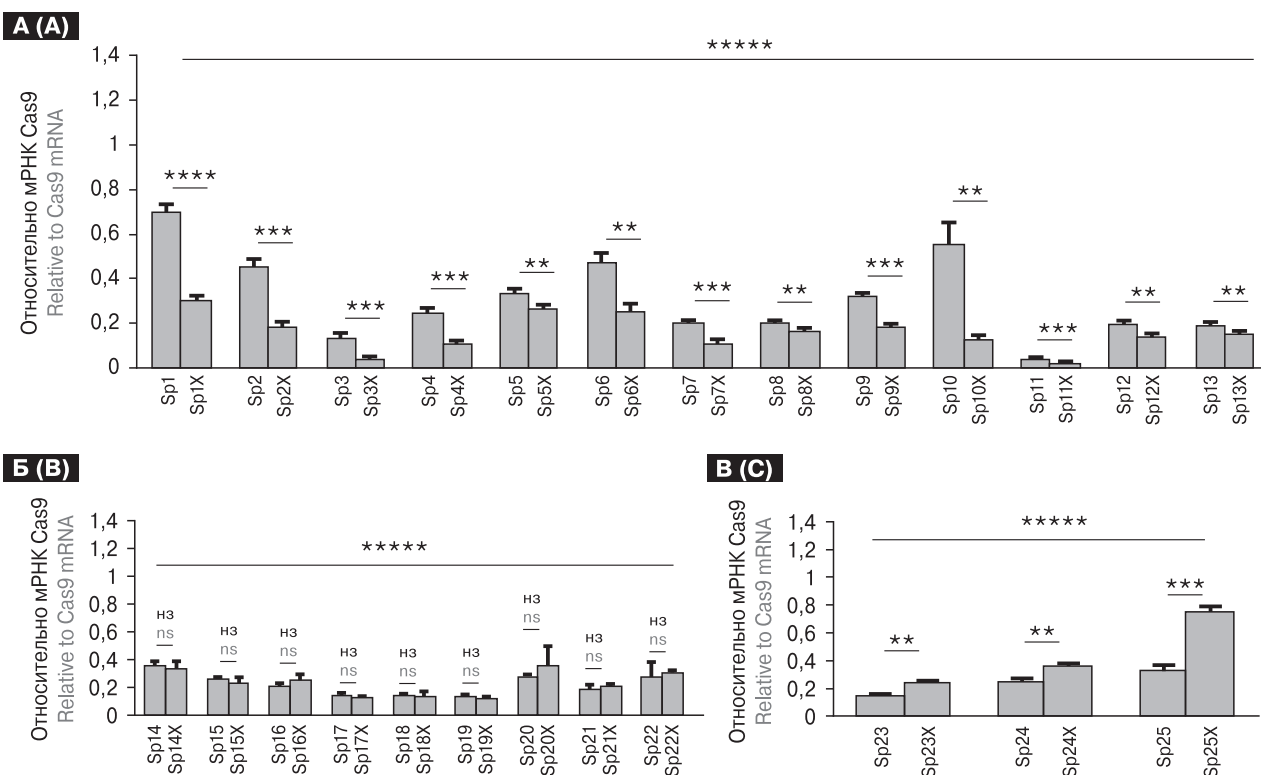


Рисунок 2. А) Экспрессия прегеномной РНК после действия системы *S. pyogenes* CRISPR/Cas9 при котрансфекции с белком HBx, повышение противовирусной активности CRISPR/Cas9.

Б-В) РНК-проводники, эффективность которых не изменяется (Б) или снижается (В) при котрансфекции HBx дикого типа

Figure 2. А) Levels of pregenomic RNA after co-transfection with *S. pyogenes* CRISPR/Cas9 and HBx for RNA guides with increased antiviral activity. Б–С) RNA guides with an antiviral efficacy that remained unaltered (Б) or declined after co-transfection by wild type HBx (С)

Примечания. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, нз — незначимые отличия. В верхней части графика указаны статистические отличия экспериментальных групп от группы контроля.

Notes. The data are represented as mean \pm standard deviation. $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns — difference is not significant. Statistical difference between experimental groups and control group is shown on the top of each graph.

Для РНК-проводника Sp11 в комбинации с плазмидой HBx (Sp11X) удалось достигнуть снижения уровня прегеномной РНК на 98%.

Различные типы белков HBx улучшают действие CRISPR/Cas9 и не оказывают токсического действия

Поскольку HBx белок дикого типа взаимодействует с рядом клеточных белков и способен активировать онкогены, были подобраны безопасные мутантные формы белков HBx: HBxMut (не взаимодействует с проапоптотическими факторами Bcl-2 и Bcl-xL) и HBxNESM (отсутствует сигнал экспорта из ядра, не вызывает образование активных форм в цитоплазме, не вызывает образование двуцепочечных разрывов). На рисунке 3 (см. II обложку) представлены наиболее характерные отличия во внутриклеточной локализации каждого из трех вышеописанных белков: HBxNESM имеет мутацию в сигнале ядерного экспорта, поэтому почти полностью локализуется в ядре, HBxmut лока-

лизуется преимущественно в цитоплазме, тогда как HBx белок дикого типа концентрируется в ядре, но распространен по всей клетке. Для работы с этими белками были отобраны 2 РНК-проводника: Sp9 (поскольку он высоко консервативен среди наиболее часто встречающихся генотипов ВГВ А–D) и Sp11 (поскольку он обладает самым высоким противовирусным действием, как в комбинации с HBx, так и без нее).

Для РНК-проводника Sp11 были проведены опыты по подбору оптимальных соотношений плазмид ВГВ, Cas9 и HBx. В таблице на рисунке 4 представлены концентрации плазмид, использованные в опыте. Эксперименты показали, что самые значительные эффекты всех типов белков наблюдаются при внесении плазмид ВГВ и Cas9 в соотношении 1:1 (0,3 мкг : 0,3 мкг) и при внесении наибольших количества HBx белков (0,65 мкг) (рис. 4А).

Для РНК-проводника Sp9 была проведена раститровка различных количеств плазмид HBx, вносимых при котрансфекции. Исходя

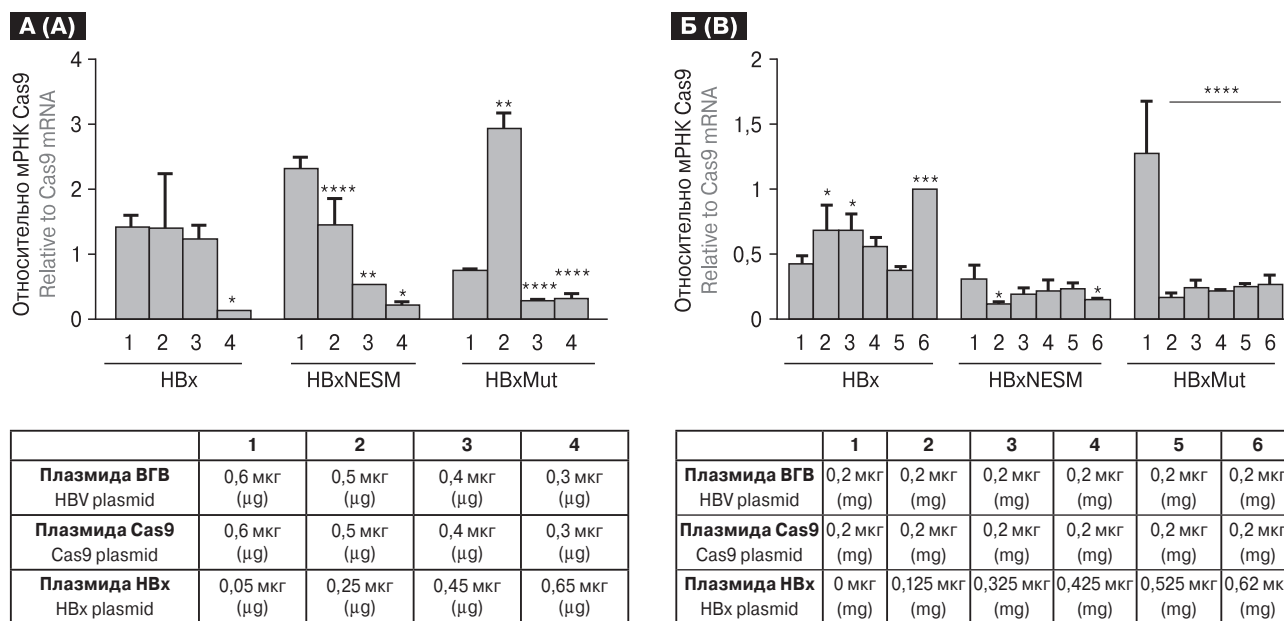


Рисунок 4. А) Подбор оптимальных соотношений кодирующих плазмид Cas9, HBx или мутантных форм (HBxmut, HBxNESM) и ВГВ с РНК-проводником Sp11 для достижения максимального противовирусного эффекта. Оптимальным было принято соотношение 4 с наименьшей нагрузкой плазмид ВГВ и Cas9 и наибольшими количествами вводимой плазмиды HBx (0,65 мкг). Б) Определение дозозависимых эффектов HBx белка дикого типа и мутантных форм HBx на противовирусное действие CRISPR/Cas9 систем на модели котрансфекции HepG2. HBxNesm и HBxmut действуют одинаково эффективно независимо от дозы. Для HBx дикого типа наблюдается некоторый дозозависимый эффект

Figure 4. A) Search for optimal concentration of Cas9, wild type or mutant HBx and HBV encoding plasmids with RNA guide Sp11 for better antiviral efficacy. It was shown that optimal ratios of the plasmid concentration was experimental settings number 4. B) Analysis of dose-dependent effects of wild type HBx and mutant forms of HBx on CRISPR/Cas9 activity at the HepG2 co-transfection model. HBxNesm and HBxmut have the same antiviral activity independently of plasmids' concentration. Dose-dependent activity is observed for different concentrations of wild-type HBx plasmid

Примечания. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. Звездочками обозначены статистически достоверные отличия экспериментальных групп от группы 1. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001.

Notes. The data are represented as mean ± standard deviation. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

из данных прошлого эксперимента, плазмиды ВГВ к Cas9 брали в соотношении 1:1, а концентрации плазмид НВх были использованы следующие: 0,125; 0,325; 0,425; 0,525 и 0,62 мкг. При раститровке плазмид, кодирующих Нвх белки, выяснилось, что НВхNESM и НВхmut усиливают противовирусные эффекты нуклеаз даже при минимальной загрузке кодирующих

плазмид, тогда как для НВх белка дикого типа наблюдается некоторая тенденция к дозозависимому эффекту (рис. 4Б).

Была проведена оценка влияния НВх белка дикого типа и мутантных форм НВх белка на пролиферацию и жизнеспособность клеток с разной загрузкой кодирующих плазмид (0,05; 0,25; 0,45; 0,65 мкг). Было выявлено, что исполь-

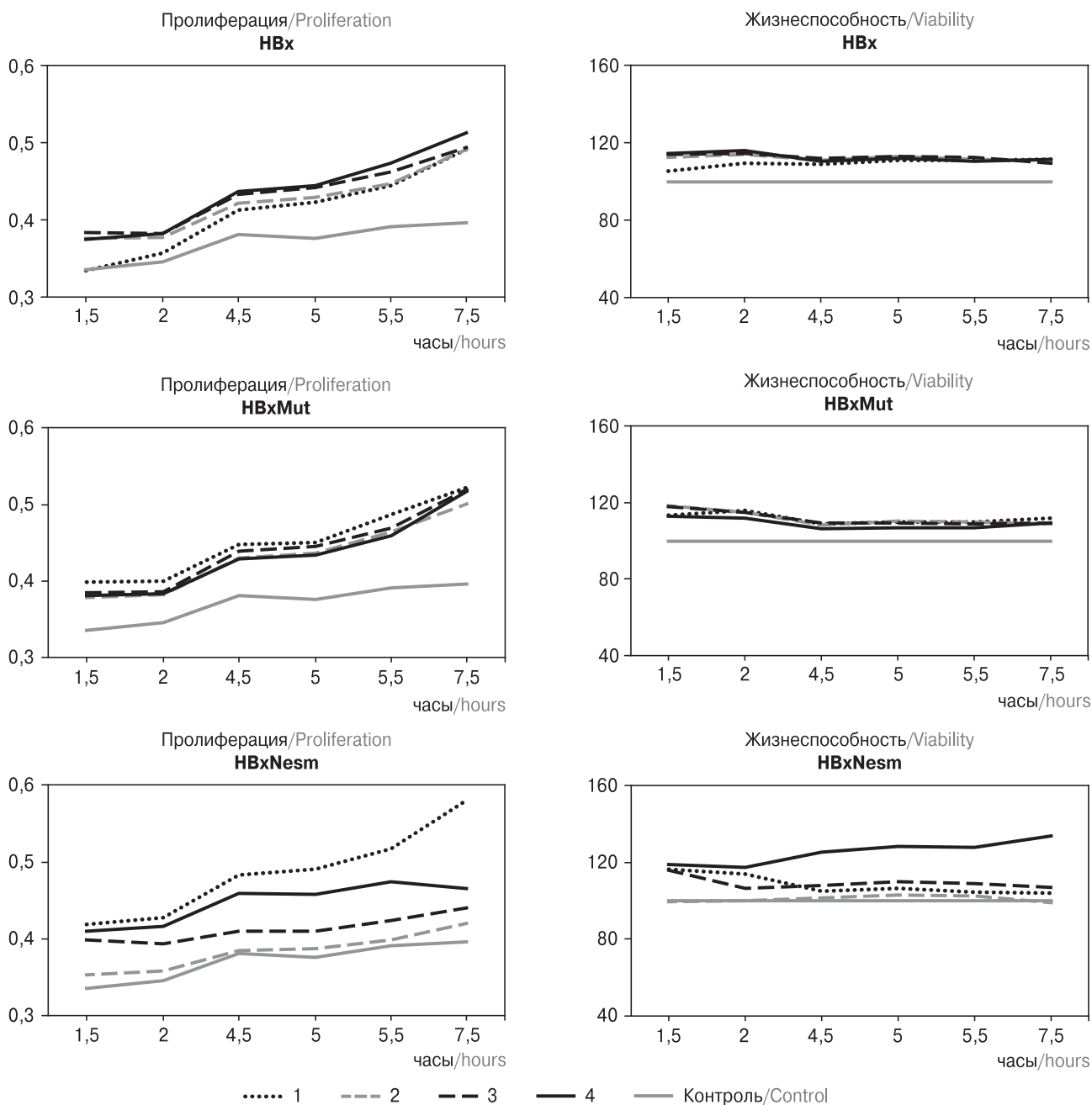


Рисунок 5. Влияние НВх белков дикого типа и мутантных форм (НВхmut, НВхNESM) на пролиферацию (слева) и жизнеспособность (справа) клеток

Figure 5. Impact of the HBx proteins on viability and proliferation of the cells

Комментарий. Клетки HepG2 были трансфицированы разными количествами (1 — 0,05 мкг; 2 — 0,25 мкг; 3 — 0,45 мкг; 4 — 0,65 мкг) плазмид, кодирующих один из НВх белков. В то время как пролиферация клеток повышается практически при всех условиях, жизнеспособность клеток при трансфекции НВх, НВхmut и НВхNesm практически не изменяется.

Comments. HepG2 cells were co-transfected with different concentration (1 — 0,05 μg; 2 — 0,25 μg; 3 — 0,45 μg; 4 — 0,65 μg) of HBx encoding plasmids. Proliferation of the cells increases and viability do not change.

зованные в экспериментах количества кодирующих HBx, HBxmut и HBxNesm плазмид не вызывают изменения жизнеспособности клеток и практически не оказывают влияния на пролиферацию клеток HepG2 (рис. 5).

Обсуждение

Хронический гепатит В является неизлечимым заболеванием, который приводит к развитию цирроза и рака печени, ответственных за гибель более 1,4 млн человек ежегодно [7]. Поэтому необходима разработка подходов к эффективной и полной элиминации вируса и ключевой формы генома ВГВ, ккзДНК. Системы CRISPR/Cas9 позволяют расщеплять матрицы ккзДНК, однако ни в одном из ранее опубликованных исследований разрушение 100% молекул ккзДНК достигнуто не было. Если предположить, что индукция мутаций в каждой из копий ккзДНК, присутствующих в клетке, технически возможна, всегда остаются риски того, что вирус может приобретать резистентность, оставаться транскрипционно активным и поддерживать репликативный цикл даже после внесения мутаций после репарации. Следовательно, применение CRISPR/Cas9 будет сопровождаться меньшей вероятностью реактивации вируса в тех условиях, когда репарация двуцепочечных разрывов в ккзДНК невозможна, а геном вируса подвергается деградации и удаляется из ядра. Одной из причин, по которым не все матрицы ккзДНК подвергаются расщеплению, является существование матриц ккзДНК в суперскрученном состоянии. Существование матриц в подобной форме может затруднять их взаимодействие с системами CRISPR/Cas9, поскольку белок Cas9 обладает более низкой нуклеолитической активностью в отношении гетерохроматина [18] [19]. HBx белок — главный регулятор эпигенетического состояния ккзДНК, способный релаксировать ккзДНК и переводить ее в транскрипционно-

активную форму, более доступную для действия нуклеаз CRISPR/Cas9 [2]. В данной работе был произведен скрининг ряда РНК-проводников, нацеленных на геном вируса гепатита В в комбинации с белками HBx. Для ряда РНК-проводников не удалось добиться усиления противовирусного действия, однако в результате экспериментов были выявлены 11 РНК-проводников, эффективность которых в комбинации с белком HBx дикого типа повышалась на 2–40%, позволяя при этом достигнуть снижения транскрипции вируса на 98%.

Помимо белка HBx дикого типа, были проанализированы эффекты мутантных белков HBxMut и HBxNesm. Были определены оптимальные соотношения плазмид, кодирующих элементы систем CRISPR/Cas9 и белков HBx, и оптимальное количество белка HBx, вызывающее самое сильное усиление противовирусного действия. Кроме того, было показано, что количества кодирующих HBx, HBxmut и HBxNesm плазмид в выбранном диапазоне не вызывают изменения жизнеспособности и пролиферации клеток.

Несмотря на то что по результатам тестов на жизнеспособность и пролиферацию не было выявлено негативных эффектов HBx дикого типа, ввиду трансактивирующей способности HBx белка не исключено его взаимодействие с онкогенами и связывание с про- и антиапоптотическими факторами, а также образование активных форм кислорода в цитоплазме и, как следствие, индукция двуцепочечных разрывов ДНК в геноме человека [9, 20]. Более целесообразным представляется использование безопасных мутантных форм HBx которые позволят если не устранить, то минимизировать возможные побочные эффекты, усилив при этом эффективность действия CRISPR/Cas9 на ккзДНК, включая высококонденсированные, гетерохроматизированные формы ккзДНК, которые не распознаются или не расщепляются классическими вариантами CRISPR/Cas9 систем.

Список литературы/References

- Allweiss L., Dandri M. The Role of cccDNA in HBV Maintenance. *Viruses*, 2017, vol. 9, no. 6: 156. doi: 10.3390/v9060156
- Belloni L., Pollicino T., De Nicola F., Guerrieri F., Raffa G., Fanciulli M., Levrero M. Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, vol. 106, no. 47, pp. 19975–19979. doi: 10.1073/pnas.0908365106
- Bock C.T., Schwinn S., Locarnini S., Fyfe J., Manns M.P., Trautwein C., Zentgraf H. Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome. *J. Mol. Biol.*, 2001, vol. 307, no. 1, pp. 183–196. doi: 10.1006/jmbi.2000.4481
- Cha M.-Y., Kim C.-M., Park Y.-M., Ryu W.-S. Hepatitis B virus X protein is essential for the activation of Wnt/beta-catenin signaling in hepatoma cells. *Hepatology*, 2004, vol. 39, no. 6, pp. 1683–1693. doi: 10.1002/hep.20245
- Dong C., Qu L., Wang H., Wei L., Dong Y., Xiong S. Targeting hepatitis B virus cccDNA by CRISPR/Cas9 nuclease efficiently inhibits viral replication. *Antiviral Res.*, 2015, vol. 118, pp. 110–117. doi: 10.1016/j.antiviral.2015.03.015
- Forgues M., Marrogi A.J., Spillare E.A., Wu C.G., Yang Q., Yoshida M., Wang X.W. Interaction of the hepatitis B virus X protein with the Crm1-dependent nuclear export pathway. *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, no. 25, pp. 22797–22803. doi: 10.1074/jbc.M101259200
- Ganem D., Prince A.M. Hepatitis B virus infection — natural history and clinical consequences. *N. Engl. J. Med.*, 2004, vol. 350, no. 11, pp. 1118–1129. doi: 10.1056/NEJMra031087

8. Geng X., Huang C., Qin Y., McCombs J.E., Yuan Q., Harry B.L., Xue D. Hepatitis B virus X protein targets Bcl-2 proteins to increase intracellular calcium, required for virus replication and cell death induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, vol. 109, no. 45, pp. 18471–18476. doi: 10.1073/pnas.1204668109
9. Kim S., Lee H.-S., Ji J.-H., Cho M.-Y., Yoo Y.-S., Park Y.-Y., Cho H. Nuclear expression of hepatitis B virus X protein is associated with recurrence of early-stage hepatocellular carcinomas: role of viral protein in tumor recurrence. *J. Pathol. Transl. Med.*, 2016, vol. 50, no. 3, pp. 181–189. doi: 10.4132/jptm.2016.03.18
10. Konerman M.A., Lok A.S. Interferon treatment for hepatitis B. *Clin. Liver Dis.*, 2016, vol. 20, no. 4, pp. 645–665. doi: 10.1016/j.cld.2016.06.002
11. Liu Y., Zhao M., Gong M., Xu Y., Xie C., Deng H., Wang Z. Inhibition of hepatitis B virus replication via HBV DNA cleavage by Cas9 from *Staphylococcus aureus*. *Antiviral Res.*, 2018, vol. 152, pp. 58–67. doi: 10.1016/j.antiviral.2018.02.011
12. Lucifora J., Xia Y., Reisinger F., Zhang K., Stadler D., Cheng X., Volz T. Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA. *Science*, 2014, vol. 343, no. 6176, pp. 1221–1228.
13. Nassal M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut*, 2015, vol. 64, no. 12, pp. 1972–1984. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309809
14. Ramanan V., Shlomai A., Cox D.B.T., Schwartz R.E., Michailidis E., Bhatta A., Bhatia S.N. CRISPR/Cas9 cleavage of viral DNA efficiently suppresses hepatitis B virus. *Sci. Rep.*, 2015, vol. 5: 10833. doi: 10.1038/srep10833
15. Seeger C., Sohn J.A. Targeting hepatitis B virus with CRISPR/Cas9. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, 2014, vol. 3: e216. doi: 10.1038/mtna.2014.68
16. Seeger C., Sohn J.A. Complete spectrum of CRISPR/Cas9-induced mutations on HBV cccDNA. *Mol. Ther.*, 2016, vol. 24, no. 7, pp. 1258–1266. doi: 10.1038/mt.2016.94
17. Shi H., Lu L., Zhang N.-P., Zhang S.-C., Shen X.-Z. Effect of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on hepatitis B virus following lamivudine treatment. *World J. Gastroenterol.*, 2012, vol. 18, no. 27, pp. 3617–3622. doi: 10.3748/wjg.v18.i27.3617
18. Uusi-Mäkelä M.I.E., Barker H.R., Bäuerlein C.A., Häkkinen T., Nykter M., Rämet M. Chromatin accessibility is associated with CRISPR-Cas9 efficiency in the zebrafish (*Danio rerio*). *PLoS One*, 2018, vol. 13, no. 4: e0196238–e0196238. doi: 10.1371/journal.pone.0196238
19. Verkuijl S.A., Rots M.G. The influence of eukaryotic chromatin state on CRISPR-Cas9 editing efficiencies. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2018, vol. 55, pp. 68–73. doi: 10.1016/j.copbio.2018.07.005
20. WHO. Global hepatitis report 2017. World Health Organization, 2017.
21. Yue D., Zhang Y., Cheng L., Ma J., Xi Y., Yang L., Xiang R. Hepatitis B virus X protein (HBx)-induced abnormalities of nucleic acid metabolism revealed by ¹H-NMR-based metabolomics. *Sci. Rep.*, 2016, vol. 6: 24430. doi: 10.1038/srep24430

Авторы:

Брезгин С.А., младший научный сотрудник лаборатории вирусных гепатитов ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия; аспирант лаборатории № 73 клинической фармакологии ФГБУ ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия;
Костюшева А.П., младший научный сотрудник лаборатории вирусных гепатитов ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;
Симирский В.Н., к.б.н., старший научный сотрудник Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия;
Волчкова Е.В., д.м.н., профессор кафедры инфекционных болезней, зав. кафедрой инфекционных болезней медико-профилактического факультета ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия;
Чистяков Д.С., лаборант ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия;
Костюшев Д.С., научный сотрудник ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;
Чуланов В.П., д.м.н., зав. лабораторией вирусных гепатитов ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия; профессор кафедры инфекционных болезней медико-профилактического факультета ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия.

Authors:

Brezgin S.A., Junior Researcher, Laboratory of Viral Hepatitis, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation; PhD Student, Laboratory of Clinical Pharmacology No. 73, Institute of Immunology FMBA, Moscow, Russian Federation;
Kostyusheva A.P., Junior Researcher, Laboratory of Viral Hepatitis, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation;
Simirskii V.N., PhD (Biology), Senior Researcher, Koltsov Institute of Developmental Biology of RAS, Moscow, Russian Federation;
Volchkova E.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Professor of the Department of Infectious Diseases, Head of the Department of Infectious Diseases on Faculty of Preventive Medicine, I.M. Sechenov Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;
Chistyakov D.S., Laboratory Technician, I.M. Sechenov Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;
Kostyushev D.S., Researcher, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation;
Chulanov V.P., PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory of Viral Hepatitis, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation; Professor of the Department of Infectious Diseases, Faculty of Preventive Medicine, I.M. Sechenov Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 24.12.2018
 Отправлена на доработку 11.03.2019
 Принята к печати 13.03.2019

Received 24.12.2018
 Revision received 11.03.2019
 Accepted 13.03.2019

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА НА ГРИППОЗНУЮ ИНФЕКЦИЮ У ЖИВОТНЫХ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ УНИВЕРСАЛЬНОЙ ВАКЦИНОЙ

Л.М. Цыбалова¹, Л.А. Степанова¹, М.А. Шуклина¹, А.В. Коротков¹,
М.В. Зайцева¹, В.И. Грищенко¹, Р.Ю. Котляров²

¹ ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородиной МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

² Институт биоинженерии, ФГУ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

Резюме. Создание кросс-реактивных вакцин, то есть вакцин, направленных на все субтипы вирусов гриппа А человека — это одна из приоритетных задач современной вакцинологии. Такого рода вакцины будут, в первую очередь, востребованы в предпандемический период и, кроме того, могут быть использованы для праймирования определенных категорий населения перед вакцинацией традиционными вакцинами из штаммов вирусов, актуальных в соответствующем эпидемическом сезоне. В отличие от традиционных вакцин универсальные не индуцируют стерилизующий иммунитет, но существенно снижают манифестацию инфекции и вероятность развития осложнений. Цель настоящей работы заключалась в оценке особенностей иммунного ответа экспериментальных животных, праймированных кандидатной универсальной вакциной, на последующую сублетальную инфекцию вирусом гриппа. Мышей иммунизировали интраназально рекомбинантным белком FlgH2-2-4M2e, содержащим консервативные пептиды двух белков вируса гриппа А: эктодомен белка М2 и аминокислотную последовательность 76–130 второй субъединицы гемагглютинина (НА2), генетически связанные с бактериальным белком флагеллином — лигандом Toll-подобных рецепторов пятого типа (TLR5). Мыши контрольной группы получали вместо кандидатной вакцины физраствор. Через 2 недели после иммунизации мыши обеих групп были заражены сублетальной дозой вируса гриппа А/Н3N2 А/Аichi/2/68. Через 2 недели после иммунизации и 1 месяц после заражения в сыворотках крови и смывах бронхоальвеолярных лаважей (БАЛ) были определены уровни иммуноглобулинов G и A. В легких определяли процентное содержание клеток CD4⁺ и CD4Tem (CD44⁺CD62L⁻), секретирующих цитокины TNF α , IFN γ , IL-2. На сублетальное заражение вирусом гриппа иммунизированные ранее мыши отвечали незначительной потерей массы тела, по сравнению с мышами контрольной группы, и более выраженной продукцией IgG и IgA в сыворотках крови и в смывах БАЛ как к пептидам, входящим в состав вакцинного препарата (M2e и aa76-130 НА2), так и к цельному вирусу гриппа А/Аichi/2/68. Количество CD4⁺ Т-клеток, секретирующих цитокины TNF α и/или IL-2 у иммунизированных мышей, значительно превосходили аналогичные пулы Т-клеток у неиммунизированных животных после заражения. Это относилось как к общим CD4⁺, так и к эффекторным Т-клеткам памяти. Именно CD4⁺ Т-клеткам памяти, по литературным данным, принадлежит ключевая роль в прайм-буст механизме действия вакцин и гетеросубтипоспецифическом иммунном ответе. В настоящем исследовании показан праймирующий эффект рекомбинантной кросс-протективной вакцины.

Ключевые слова: грипп А, рекомбинантная вакцина, экспериментальные животные, иммунный ответ.

Адрес для переписки:

Цыбалова Людмила Марковна
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 15/17,
ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородиной МЗ РФ.
Тел./факс: 8 (812) 499-15-18.
E-mail: sovet@influenza.spb.ru

Contacts:

Liudmila M. Tsybalova
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Professora
Popova str., 15/17, Smorodintsev Research Institute of Influenza.
Phone/Fax: +7 (812) 499-15-18.
E-mail: sovet@influenza.spb.ru

Библиографическое описание:

Цыбалова Л.М., Степанова Л.А., Шуклина М.А., Коротков А.В.,
Зайцева М.В., Грищенко В.И., Котляров Р.Ю. Особенности иммунного
ответа на гриппозную инфекцию у животных, вакцинированных
универсальной вакциной // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 3–4.
С. 485–494. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-485-494

Citation:

Tsybalova L.M., Stepanova L.A., Korotkov A.V., Shuklina M.A., Zaitseva M.V.,
Grishchenko V.I., Kotlyarov R.Yu. Features of immune response against influenza
infection in animals vaccinated with recombinant cross-protective vaccine //
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9,
no. 3–4, pp. 485–494. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-485-494

FEATURES OF IMMUNE RESPONSE AGAINST INFLUENZA INFECTION IN ANIMALS VACCINATED WITH RECOMBINANT CROSS-PROTECTIVE VACCINE

Tsybalova L.M.^a, Stepanova L.A.^a, Korotkov A.V.^a, Shuklina M.A.^a, Zaitseva M.V.^a, Grishchenko V.I.^a, Kotlyarov R.Yu.^b

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

^b Research Institute of Bioengineering, FIC «Fundamentals of Biotechnology» RAS, Moscow, Russian Federation

Abstract. Generating cross-reactive vaccines aimed at targeting all human influenza A virus subtypes is among high priority tasks in contemporary vaccinology. Such vaccines will be primarily demanded during pre-pandemic period as well as used to prime some population cohorts prior to vaccination with standard vaccines containing area-relevant epidemic virus. Unlike routine approach universal vaccines do not induce a sterilizing immunity, but significantly ameliorate overt infection and probable complications. Our study was aimed at evaluating characteristics of immune response in experimental animals primed with a candidate universal vaccine challenged with sublethal influenza A virus infection. Mice were immunized intranasally with the recombinant protein FlgH2-2-4M2e containing conservative peptides derived from two influenza A virus proteins: M2 protein ectodomain and 76–130 amino acid sequence from the second hemagglutinin (HA2) subunit genetically linked to bacterial flagellin protein, which is a ligand for Toll-like receptor 5 (TLR5). Control mice received saline. Two weeks after immunization, mice from both groups were infected with a sublethal dose of A/Aichi/2/68 AN3N2 influenza virus strain. Level of immunoglobulins G and A in the blood sera and bronchoalveolar lavages (BAL) were determined two weeks after immunization and 1 month post infection. Percentage of lung CD4⁺ T and CD4⁺ Tem (CD44⁺CD62L⁻) cells secreting cytokines TNF α , IFN γ , IL-2 was determined. Immunized vs. control mice responded to sublethal infection with the influenza virus by insignificant weight loss and more pronounced production of vaccine peptide-specific (M2e and aa76–130 HA2) and pan-influenza A/Aichi/2/68 virus IgG and A in the blood sera and BAL. After challenge the number of CD4⁺ T cells secreting cytokines TNF α and/or IL-2 in immunized mice significantly exceeded counterpart T cells in unimmunized animals that was true for both CD4⁺T and CD4⁺ Tem cells. Memory CD4⁺ T cells were previously shown to play a key role in the prime-boost event and heterosubtypic immune response. Thus, we were able to demonstrate a priming effect for recombinant cross-protective vaccine used in our experiment.

Key words: influenza A, recombinant vaccine, experimental animals, immune response.

Введение

В последнее десятилетие достигнуты значительные успехи в разработке так называемых «универсальных» вакцин, направленных на все субтипы вирусов гриппа А [4, 9, 20]. Две универсальные вакцины — Multimeric-001 (производство BiondVax) и Flu-v (производство компании SEEEK) — зарегистрированы [14], несколько находятся на стадии клинических исследований [20]. Вероятно, подобные вакцины или их улучшенные варианты в ближайшее время прочно войдут в практику вакцинации против гриппа. Основное назначение таких препаратов — вакцинация населения в начальный период распространения пандемического вируса. Этот период характеризуется серьезным отставанием (в несколько месяцев) производства штаммоспецифических вакцин из пандемического вируса от начала эпидемий, вызванных этим вирусом.

Особенность универсальных вакцин состоит в том, что в их основе лежат консервативные белки/пептиды, с высокой степенью гомологии для вирусов гриппа А всех субтипов. Такие вакцины, в отличие от традиционных, содержащих поверхностные высоковариабельные вирусные белки, не обладают выраженным вируснейтрализующим эффектом, но способны значительно уменьшить манифестацию инфекции и предотвратить осложнения. Для их производства требуется несколько недель, и к началу эпидемии

в стране, вызванной пандемическим вирусом, может быть наработано достаточное количество доз для вакцинации населения. Второе возможное применение таких вакцин — праймирование отдельных контингентов населения перед сезонной вакцинацией. Показано, что иммунизация пожилых людей кросс-реактивной вакциной Multimeric-001 значительно улучшает иммунный ответ на последующую вакцинацию сезонной вакциной [2].

Вакцины на основе консервативных вирусных белков могут также быть использованы для праймирования маленьких детей. На фоне вакцинации универсальной вакциной заболевания будут протекать в облегченной форме и с полноценным иммунным ответом на все вирусные белки, а не только на поверхностные, как это происходит при вакцинации субъединичными вакцинами.

Цель настоящего исследования состояла в оценке особенностей иммунного ответа экспериментальных животных, праймированных универсальной вакциной, на последующую сублетальную инфекцию вирусом гриппа.

Материалы и методы

Рекомбинантный белок. Ген, кодирующий рекомбинантный белок Flg-HA2-2-4M2e, был сконструирован специалистами ФИЦ Биотехнологии РАН с использованием стандартных

методов генетической инженерии [24]. Белок Flg-NA2-2-4M2e содержит аминокислотную последовательность флагеллина из *Salmonella Typhimurium*, к которой на С-конце присоединен фрагмент второй субъединицы гемагглютинина — HA(aa76–130), консенсусный для вирусов гриппа А субтипов АН3 и АН7, относящихся ко второй филогенетической группе. Последовательность aa76–130 в нативном гемагглютинине входит в состав большой α -спирали и доступна с поверхности молекулы. За ним следуют 4 копии эктодомена белка М2 (М2е) вирусов гриппа А человека в сочетании М2h-М2s-М2h-М2s, где М2h — аминокислотная последовательность пептида М2е, консенсусная для вирусов гриппа А человека субтипов Н1N1, Н2N2, Н3N2; М2s — аминокислотная последовательность М2е пандемического вируса А/Н1N1/pdm09. Последовательности М2h и М2s отличаются друг от друга четырьмя аминокислотами и включение в белковую конструкцию обоих пептидов расширяет спектр защитного действия препарата. Все фрагменты отделены друг от друга глицин-богатыми линкерами. Для конструирования вектора, экспрессирующего рекомбинантный белок Flg-NA2-2-4M2e, была использована плазида рQE30, куда клонировали нуклеотидную последовательность, кодирующую гибридный белок.

Экспрессия и очистка рекомбинантных белков. С целью получения штаммов, продуцирующих рекомбинантные белки, клетки *E. coli* штамма DLT1270 трансформировали плазмидой рQE30/Flg-NA2-4M2e. Штаммы-продуценты накапливали в среде LB с ампициллином до середины логарифмической фазы роста ($OP_{600} = 0,4–0,7$) при 37°C, затем добавляли IPTG до конечной концентрации 0,1 мМ и культивировали в течение еще 4 ч при 37°C. Клетки обрабатывали лизоцимом, рекомбинантные белки очищали из клеточного лизата с помощью металл-аффинной хроматографии на Ni-сорбенте.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ) и вестерн-блот. Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) в восстанавливающих условиях проводили по методу Лэммли [16]. Электрофорез проводили при 12 мА до достижения фронтом красителя (бромфенолового синего)

нижнего края геля. Гель окрашивали в растворе Кумасси G-250 в течение ночи при качении. После окрашивания гель отмывали в бидистиллированной воде и документировали при помощи системы ChemiDoc MP System (Bio-Rad, США).

Белки разделяли при помощи электрофореза в полиакриламидном геле и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США). Затем мембрану блокировали в 3% растворе БСА (бычий сывороточный альбумин) в течение ночи при комнатной температуре. Белки определяли окрашиванием мембраны мышинными моноклональными антителами к белку М2 вируса гриппа А (14С2, ab5416; Abcam, Великобритания) в разведении 1:16 000 и кроличьими поликлональными антителами к флагеллину (ab93713, Abcam, Великобритания) в разведении 1:8000. Мембрану инкубировали 1 ч при комнатной температуре с антителами, разведенными в PBS с 0,1% твин 20 (PBS-T) и 3% БСА, затем отмывали в PBS-T. Белок определяли окрашиванием мембраны в течение 1 ч при комнатной температуре козьими антимышиными или антикроличьими IgG, мечеными пероксидазой хрена (Abcam, Великобритания), в разведении 1:2000 и последующей инкубацией 5 мин в ТМВ (тетраметилбензидин) Immunoblot solution (Invitrogen, США).

Лабораторные животные. В исследовании были использованы линейные мыши (самки) Balb/c массой 16–18 г (возраст 6–8 недель), полученные из сертифицированного питомника Столбовая ГУ Научный центр биомедицинских технологий РАН. Животных содержали в виварии ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России. Основные правила содержания и ухода соответствовали нормативам, изложенным в ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными». Протокол опыта был утвержден Комиссией по биоэтике Института.

Иммунизация и заражение экспериментальных животных. Мышей иммунизировали интраназально (и/н) рекомбинантным белком в дозе 10 мкг/0,02 мл трехкратно с интервалом 2 недели (рис. 1). Иммунизацию проводили после ингаляционной анестезии смесью 2–3% изофлюран, 30% O₂, 70% N₂O. Контрольным мышам вводили и/н 0,02мл PBS.



Рисунок 1. Схема проведения эксперимента на мышах

Figure 1. The scheme of the experiment in mice

Для заражения мышей был использован штамм вируса гриппа, адаптированного к мышам, — A/Aichi/2/68 (H3N2). Мышей заражали сублетальной дозой (100 мышинных инфицирующих доз — MID100) вируса гриппа A/Aichi/2/68 на 14 день после последней иммунизации. Вирус вводили интраназально в объеме 50 мкл/мышь после ингаляционной анестезии. В качестве отрицательного контроля в эксперименте использовали мышей, которым вводили PBS. После заражения проводили ежедневное наблюдение за животными в течение 14 суток. Протективное действие рекомбинантного белка оценивали по динамике массы тела. В течение двухнедельного периода ежедневно в одно и то же время измеряли массу тела животных.

Получение сывороток крови и бронхоальвеолярных лаважей (БАЛ). Через 2 недели после третьей иммунизации (42 день исследования) и через месяц после заражения (72 день исследования) производили тотальный забор крови от пяти из десяти мышей каждой группы, соответственно, после их эвтаназии в CO₂-камере (VetTech Solutions, Великобритания). Полученную кровь инкубировали в течение 30 мин при температуре 37°C. Образцы крови с образовавшимися сгустками помещали на поверхность льда и охлаждали в течение 1 ч, затем центрифугировали в течение 15 мин при 400g. Аликвоты сыворотки крови (по 30 мкл) замораживали и хранили до использования при температуре –20°C. Бронхоальвеолярные смывы получали на 42 день исследования от мышей после эвтаназии путем двукратного промывания трахеи 500 мкл буферного раствора посредством IV катетера (BD Bioscience, США) и хранили до использования также при t = –20°C.

Получение суспензии клеток легких. Мышечные легкие получали через 2 недели после третьей иммунизации и через месяц после сублетального заражения. Легкие удаляли асептически и помещали в пробирки типа «эппендорф» со средой RPMI-1640 содержащей 0,5 мг/мл коллагеназы (Sigma, C2674) и 25 мкг/мл ДНКазы (Sigma, D4263). Легкие гомогенизировали с использованием TissueLyser II, помещали в термошейкер (45 мин, 37°C) и избавлялись от дебриса путем фильтрации (фильтрующие шприцы с диаметром пор 70 мкм, BD Biosciences, США). Эритроциты лизировали АСК буфером (0,15M NH₄Cl, 1,0M KHCO₃, 0,1 mM Na₂EDTA, pH 7,2–7,4) альвеолярные макрофаги отмывали полной средой RPMI-1640 с 10% ЭТС, 2 mM L-глутамина, 100 IU/ml пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина. Концентрацию клеток доводили до 5 × 10⁶ кл/мл.

Иммуноферментный анализ. Сыворотки и БАЛ исследовали в ИФА с использованием 96-луночных планшет (Greiner, Германия). Титры антител определяли индивидуально у 5 мышей каждой группы. В качестве твердой фазы использовали синтетический пептид (G-37) —

5 мкг/мл, содержащий последовательности пептида M2e, консенсусного для вирусов гриппа человека (5мкг/мл), синтезированный в «НПО Верта» (Санкт-Петербург) или очищенный вирус A/Aichi/2/68 (H3N2) — 2 мкг/мл. Планшет блокировали фосфатным буферным раствором с 5% ЭТС. Использовали поликлональные овечьи антимышечные IgG и IgA (Abcam, Великобритания), меченые пероксидазой хрена. Для определения субклассов IgG также использовали поликлональные меченные пероксидазой хрена овечьи IgG1, IgG2a (Abcam, Великобритания). В качестве субстрата использовали ТМБ (тетраметилбензидин) (BD Bioscience). После инкубации в течение 15 мин проводили учет реакции на микропланшетном ридере I-Mark (BioRad) при длине волны 450 нм. За титр принимали наибольшее разведение сыворотки, которое давало оптическую плотность, по крайней мере, в 2 раза большую, чем бланк.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА). РТГА проводили в соответствии с Методическими рекомендациями «Выделение вирусов гриппа в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация» (М., 2006). Сыворотку, предварительно обработанную RDE (рецептор-деструктурирующий фермент) и разведенную PBS, вносили в первый ряд 96-луночного микроплшета с U-образными лунками. Далее готовили ряд последовательных двукратных разведений сыворотки в объеме 50 мкл и добавляли по 50 мкл вируса в стандартной концентрации 4ГЭЕ/50 мкл. После инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре во все лунки вносили по 100 мкл 0,5% взвеси эритроцитов. Через 30 мин проводили учет результатов реакции. Титр антигемагглютинирующих антител выражали как величину, обратную наибольшему разведению сыворотки, при котором наблюдалось торможение агглютинации.

Мультипараметрическая проточная цитометрия. Мультипараметрическую проточную цитометрию выполняли в соответствии с протоколом BD Pharmingen™. В легких определяли CD4⁺ Т-лимфоциты, продуцирующие цитокины, после стимуляции одним из вирусных пептидов M2e или HA aa76–130, или вирусом гриппа A/Aichi/2/68. Клетки стимулировали в течение 6 ч при 37°C в присутствии брефелдина А (1 мкг/мл) (BD Bioscience, США). После отмывания клеток полной средой RPMI, Fc-рецепторы блокировали антителами CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block, BD Pharmingen, США), затем инкубировали с Zombie Aqua (Zombie Aqua Fixable Viability Kit, Biolegend, США) для выявления живых клеток. Клетки окрашивали CD3a-FITC, CD4 PerCP, CD62L-PE-Cy7, CD44-APC (BD Pharmingen, США) при температуре +2...+8°C в течение 30 мин. Затем клетки пермеабилizировали в соответствии с Протоколом тест-системы Cytotfix/Cytoperm Plus (BD Bioscience, США) и окраши-

вали TNF α -BV421, IFN γ -PE (BD Pharmingen, США), IL-2. Сбор данных (собирали 100 000 живых CD3⁺ лимфоцитов) выполняли на проточном цитометре BD FACS Canto II (Becton Dickinson, США). Данные анализировали в программном пакете Kaluza, версия 1.5a (Beckman Coulter, США).

Статистическая обработка. Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism v6.0. С учетом положительных результатов проверки данных на нормальность распределения (тест Колмогорова–Смирнова) статистическую значимость различий титров антител и антигенспецифических Т-клеток оценивали с использованием t-критерия Стьюдента. Различия считали значимыми при $p > 0,05$.

Результаты

Подлинность рекомбинатного белка Flg-NA2-2-4M2e была подтверждена методом электрофореза и в Вестерн-блоте. Электрофоретическая подвижность белка в ПААГ соответствовала рассчитанной молекулярной массе — 73,9 kDa, а очищенный белок взаимодействовал с моноклональными анти-M2 антителами (14C2) и поликлональными антителами к флагеллину.

Наружный фрагмент M2 белка (M2e) вирусов гриппа А является слабым иммуногеном в силу малого размера (24aa). Поэтому после естественной инфекции или вакцинации антитела (АТ) к этому белку если и определяются, то в незначительных количествах и преимущественно у лиц пожилого возраста [27]. Это подтверждается и в настоящем исследовании низкими уровнями сывороточных IgG и IgA в ответ на сублетальную инфекцию у неиммунизированных мышей (контрольная группа) (рис. 2, А–Г). У мышей, предварительно иммунизированных рекомбинантным белком (кандидатной вакциной), вирусная инфекция вызывала рост анти-M2e IgG и IgA как в сыворотках крови, так и в БАЛ (рис. 2, А–Г). Антитела в РТГА после иммунизации рекомбинантным белком, содержащим участок стебля гемагглютинина, у мышей не определялись, но на вирусную инфекцию иммунизированные животные отвечали более высокими титрами IgG, направленными к целому вирусу (рис. 2Е).

Положительным фактом было также то, что у иммунизированных мышей после заражения соотношение субклассов IgG изменилось в сторону увеличения IgG2a (с 1,34% от суммарного значения IgG1 и IgG2a до 12,56%). Доказано, что именно IgG2a играют ключевую роль в антителозависимой цитотоксичности АЗЦТ [7, 18], одного из основных механизмов защиты подобного рода вакцин.

Помимо антительного ответа, иммунизация животных рекомбинантным белком Flg-NA2-2-4M2e индуцировала образование CD4⁺

Т-клеток (рис. 3А). Через две недели после иммунизации у мышей выявлялись M2e- и HA2-специфические Т-клетки, продуцирующие либо один из цитокинов — фактор некроза опухоли — 0,08% к M2e, либо два цитокина: фактор некроза опухоли (TNF α) и интерлейкин 2 (IL-2) (0,06%) к обоим пептидам. В ответ на стимуляцию цельным вирусом А/Н3N2 были выявлены CD4⁺ Т-клетки — продуценты TNF α (0,102) и CD4⁺ Т-клетки — продуценты TNF α и IL-2 (0,064). Иммунизация приводила также к появлению в легких мышей M2e-специфических CD4⁺ эффекторных Т-клеток памяти (Tem, CD44⁺CD62L⁻) (рис. 3Б), которые секретировали TNF α (0,2%) и TNF α и IL-2 (0,19%). Клетки CD4⁺Tem, специфические к HA2, относились преимущественно к двойным продуцентам TNF α +IL-2 (0,18%). На стимуляцию цельным вирусом клетки отвечали, в основном, также продукцией TNF α . Таким образом, после иммунизации увеличилось количество CD4 Т-клеток как общих, так и эффекторных, продуцирующих фактор некроза опухоли (TNF α) или одновременно TNF α и IL-2 к M2e пептиду, TNF α и IL-2 к пептиду HA2, а также увеличилось количество TNF α -продуцирующих клеток к целому вирусу.

Особенностями иммунного ответа иммунизированных мышей на вирусное заражение был гораздо более активный CD4⁺ Т-клеточный ответ по сравнению с неиммунизированными. В первую очередь это касалось увеличения количества M2e- и HA2-специфических CD4⁺ Т-клеток — продуцентов TNF α и TNF α +IL-2 (рис. 4А). Кроме того, появились клетки, продуцирующие одновременно IFN γ и TNF α , и клетки тройные продуценты: IFN γ +TNF α +IL-2.

Аналогичные результаты были получены и при оценке цитокинпродуцирующих M2e- и HA2-специфических эффекторных клеток памяти CD4⁺ Tem в легких. На рисунке 4Б представлены уровни эффекторных CD4⁺ Т-клеток памяти (Tem, CD44⁺CD62L⁻) через 1 месяц после заражения вирусом гриппа. По сравнению с неиммунизированными мышами у иммунизированных после стимуляции пептидами M2e и HA2 многократно увеличилось количество клеток, секретирующих один цитокин TNF α (2,0 и 0,27% соответственно), два цитокина TNF α +IL-2 (1,9 и 0,7%), появились продуценты двух цитокинов IFN γ +TNF α (0,3 и 0,1%) и также, как и у неиммунизированных мышей, стимуляция пептидами выявляла клетки памяти, продуцирующие три цитокина: IFN γ +TNF α +IL-2.

Эффект более сильного иммунного ответа на инфекцию у мышей, иммунизированных рекомбинантной кандидатной вакциной, отразился и в клиническом течении инфекции (рис. 5). У иммунизированных животных максимальная потеря веса — основного показателя состояния здоровья — составляла 6% на 7 день после за-

ражения, при этом вес полностью восстановился на 14 день, тогда как неиммунизированные мыши теряли до 14% веса тела (11 день) и к 14 дню наблюдения дефицит веса еще составлял 8%.

Обсуждение

Исследуемый препарат содержал консервативные фрагменты двух белков вируса гриппа А.

Эктодомен белка М2 (М2е) представляет собой последовательность, состоящую из 24 аминокислотных остатка и индуцирующую образование специфических Ig, что было показано разными исследователями [7, 9, 25]. Включенная в белок последовательность aa76–130 второй субъединицы гемагглютинина, консенсусная для вирусных субтипов Н3 и Н7 (гомология составляет 63,6%, а с учетом заменяемых аминокислот — 80%), име-

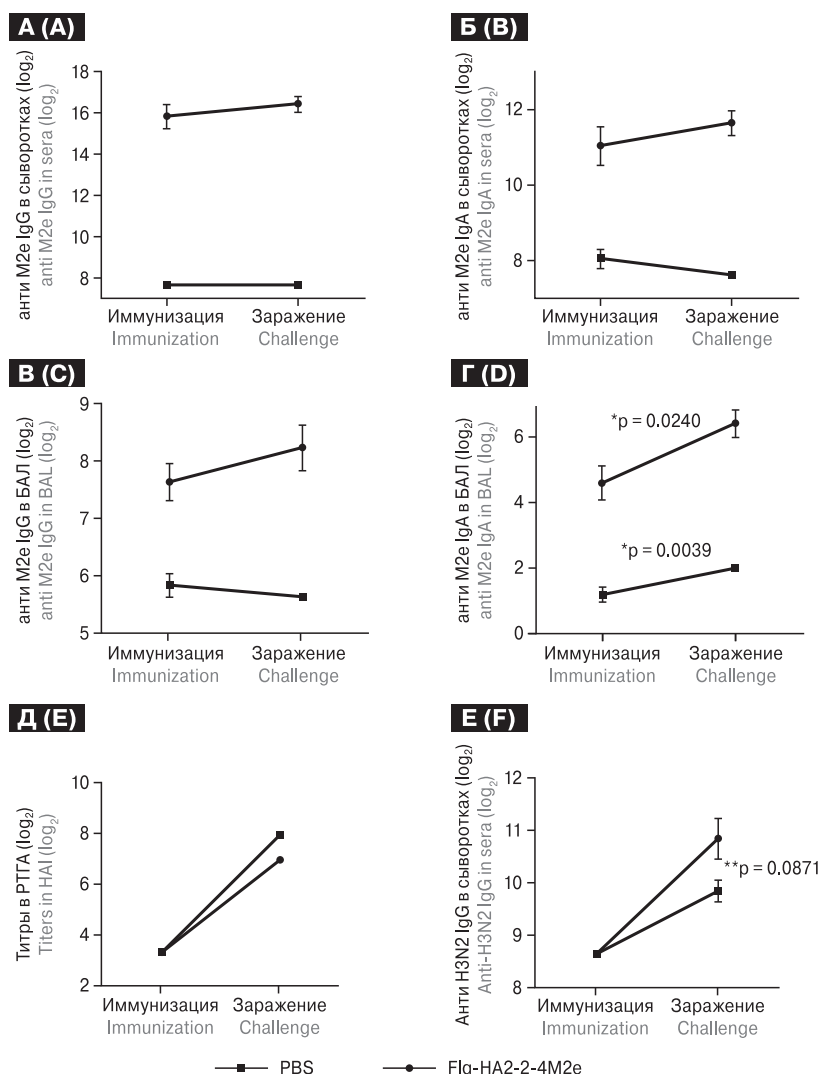


Рисунок 2. Уровни антигенспецифических антител (IgG, IgA и антигемагглютининов) в сыворотках крови (А, Б, Д, Е) и бронхоальвеолярных смывах (В, Г) мышей, иммунизированных кандидатной вакциной Flg-HA2-2-4M2e или получивших физраствор, после иммунизации и после сублетального заражения вирусом гриппа А/Aichi/2/68 (H3N2)

Figure 2. Antigen-specific antibodies (IgG, IgA, antihemagglutinins) in sera (A, B, E, F) and bronchoalveolar lavages (C, D) of mice immunized with candidate vaccine Flg-HA2-2-4M2e or PBS after immunization and after challenge with the influenza virus A/Aichi/2/68 (H3N2)

Примечания. Группа 1 (●) — мыши иммунизированы трехкратно рекомбинантным белком Flg-HA2-2-4M2e, и/н, в дозе 10 мкг/мышь; группа 2 (■) — мыши получали трехкратно физ. раствор и/н 10 мкг/мышь. А–Г — различия между контрольной и опытной группой везде статистически достоверны — $p < 0,001$. * p — указаны различия между уровнем Ig после иммунизации и сублетальной инфекции; ** p — указаны различия между иммунизированными и неиммунизированными мышами после сублетальной инфекции.

Notes. Group 1 (●) — mice immunized i/n three times with protein Flg-HA2-2-4M2e at a dose of 10 $\mu\text{g}/\text{mouse}$; group 2 (■) — control (PBS). A–D — the differences between the control and experimental groups are statistically significant everywhere — $p < 0.001$. * p — statistical differences between the levels of Ig post immunization and post sublethal infection are indicated; ** p — statistical differences between the levels of Ig post sublethal infection at immunized and non-immunized mice.

ет как В-клеточные, так и Т-клеточные эпитопы [24]. В качестве белка-носителя для этих целевых пептидов был использован флагеллин — бактериальный белок, обладающий также и адьювантными свойствами. Флагеллин является лигандом TLR5 на антигенпрезентирующих клетках и способен стимулировать CD4⁺ Т-клетки [3, 5, 8].

Иммунизация мышей ожидаемо индуцировала выработку специфических IgG и IgA к M2e пептиду (G37) как в сыворотках крови, так

и в смывах БАЛ, и не сказалась на уровне в сыворотках крови антигемагглютининов и Ig, направленных на цельный вирус. Но на сублетальное заражение вирусом A/Aichi/2/68 (H3N2) иммунизированные особи отвечали не только более активным образованием IgG и IgA к пептиду M2e, но и образованием сывороточных IgG к целому вирусу гриппа.

Основным механизмом действия M2e-специфических антител является атителозависимый

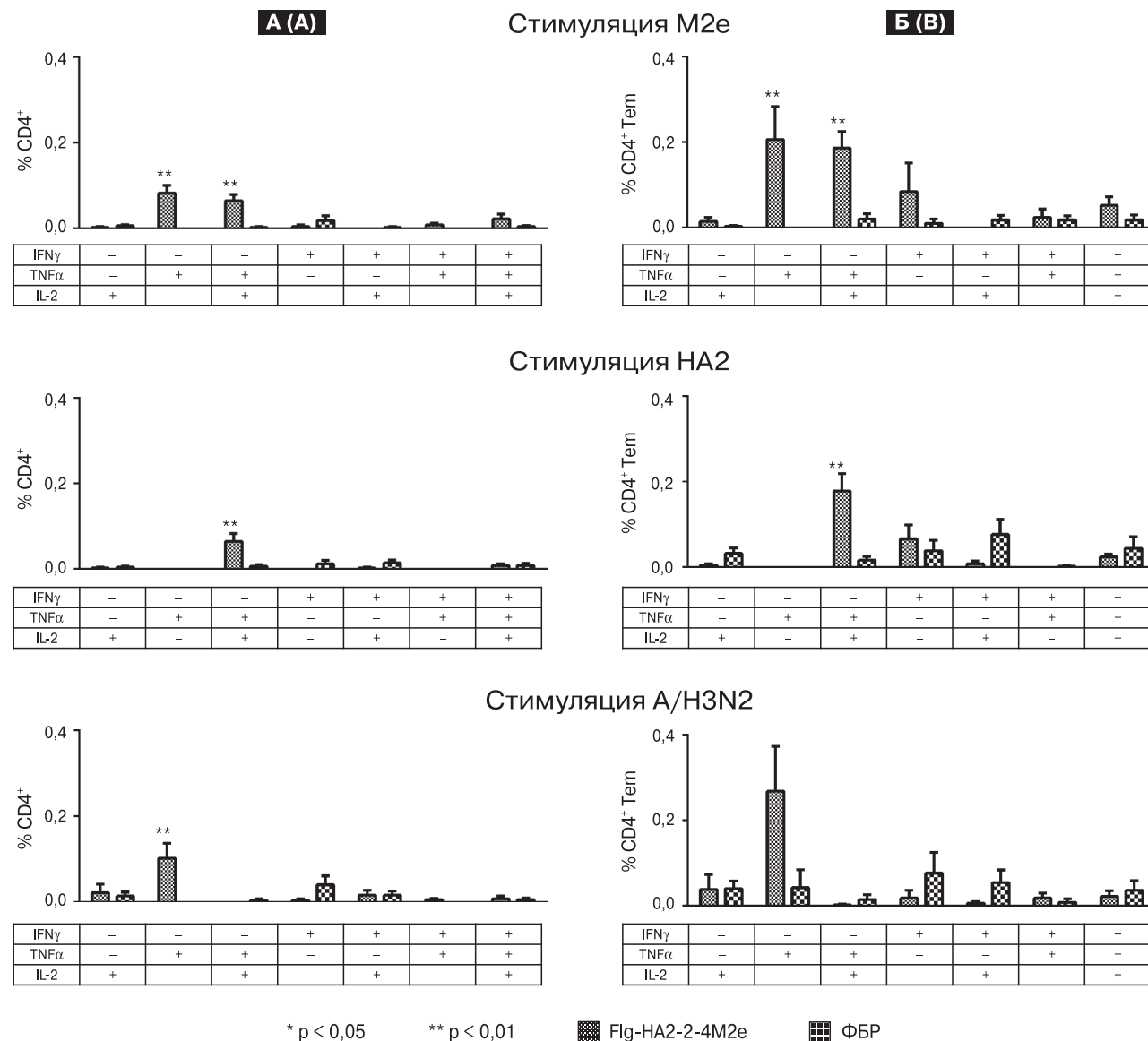


Рисунок 3. Продукция цитокинов (IFN γ , TNF α , IL-2) антигенспецифическими и вирусспецифическими CD4⁺ Т-клетками (А) и CD4⁺ эффекторными Т-клетками памяти (Б) легких у мышей после иммунизации рекомбинантным белком

Figure 3. Cytokine production (IFN γ , TNF α , IL-2) by antigen-specific and virus-specific CD4⁺ T cells in mice lung after immunization (A) and challenge (B)

Примечания. По оси абсцисс — субпопуляции цитокин-продуцирующих CD4⁺ Т-клеток, по оси ординат — % CD4⁺ Т-клеток, продуцирующих цитокины. Внутриклеточное окрашивание цитокинов после 6-часовой активации пептидами (M2e или HA2) и вирусом A/Aichi/1/68. Для выявления CD4⁺ Т-клеток, продуцирующих один, два или три цитокина использовали гейтирование по Boolean. *p < 0,05; **p < 0,01.

Notes. Absciss — subpopulations of cytokine-producing CD4⁺ T-cells; ordinate — % CD4⁺ T-cells producing cytokines. Intracellular cytokine staining after 6 hours of activation with peptides (M2e and HA2). To identify mono-, double, and triple cytokine producers of CD4⁺ T cells, Boolean gating was used. *p < 0.05; **p < 0.01.

мая цитотоксичность (АЗЦТ) и комплемент-зависимый фагоцитоз [10, 15]. Специфические IgG к M2e пептиду опосредуют АЗЦТ через Fc-рецепторы на натуральных киллерах, макрофагах, дендритных клетках и способствуют клиренсу организма от вирусов. Ключевое значение имеют Ig подкласса G2a, которые реагируют, в отличие от IgG1, с тремя типами Fcγ клеточных рецепторов (FcγRI, FcγRIII, FcγRIV) [10, 19]. Иммуноглобулины подкласса IgG1 связываются только с рецепторами FcγRIII и через них способствуют поглощению опсонизированных инфицированных клеток макрофагами [13]. Такая функциональная недостаточность IgG1 может компенсироваться их более высокими титрами, по сравнению с IgG2a.

Адаптивный иммунный ответ обеспечивается не только специфическими Ig, но и CD8⁺ и CD4⁺ Т-клетками. В настоящей работе мы исследовали изменение CD4⁺ Т-клеточного ответа иммунизированных и неиммунизированных животных на последующую инфекцию. Антивирусная защита организма, опосредованная CD4⁺ Т-клетками, реализуется разными путями [17, 26]: CD4⁺ Т-клетки активируют В и CD8⁺ клетки, способствуют развитию воспаления. CD4⁺ Т-клетки памяти осуществляют функцию противоинфекционной защиты в синергизме с CD8⁺ и В-клетками, но вместе с тем способны защищать от низких доз вируса и независимо от других лимфоцитов и предсуществующих антител. При этом они стимулируют врожден-

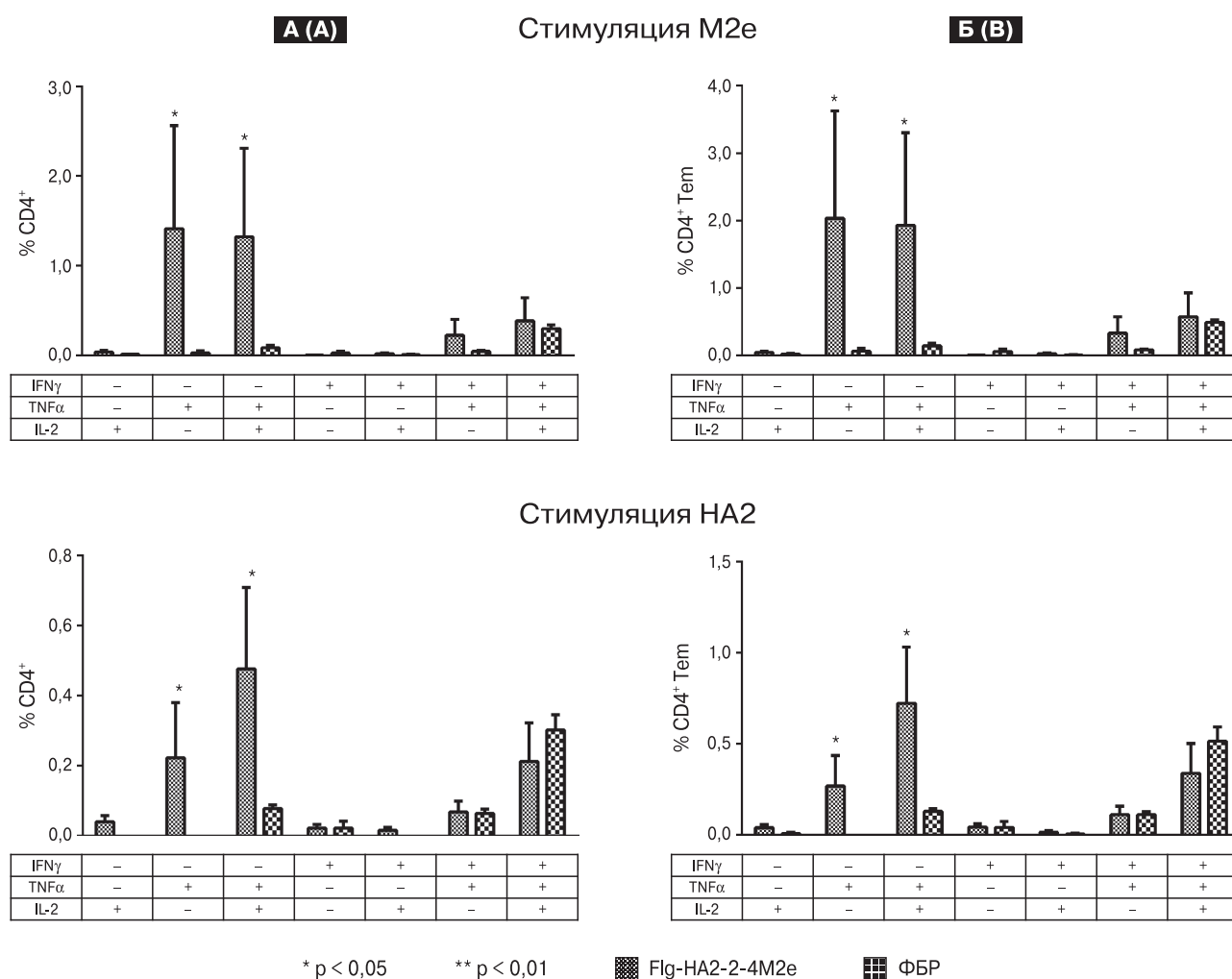


Рисунок 4. Продукция цитокинов антигенспецифическими CD4⁺ Т-клетками общими (А) и эффекторными клетками (Б) памяти в легких через 1 месяц после вирусного заражения

Figure 4. Production of cytokines by antigen-specific CD4⁺ T-cells with common (A) and effector cells (B) of memory in the lungs 1 month after viral infection

Примечания. По оси абсцисс — субпопуляции цитокин-продуцирующих CD4⁺ Т-клеток, по оси ординат — % CD4⁺ Т-клеток, продуцирующих цитокины. Внутриклеточное окрашивание цитокинов после 6-часовой активации пептидами (M2e и HA2). Для выявления CD4⁺ Т-клеток, продуцирующих один, два или три цитокина использовали гейтирование по Boolean. *p < 0,05; **p < 0,01.

Notes. Intracellular cytokine staining after 6 hours of activation with peptides (M2e and HA2). To identify mono-, double, and triple cytokine producers of CD4⁺ T cells, Boolean gating was used.

ный иммунитет [21]. McKinstry K. и другие авторы показали, что в отсутствии В и CD8⁺ клеток защита осуществляется CD4⁺ Т-клетками памяти и сильно зависит от IFN γ [17, 23, 26]. В нашем опыте иммунизация кандидатной вакциной приводила к образованию специфических CD4⁺ Т-клеток памяти, как к М2е пептиду, так и к HA2 (aa76–130). Количество Т-клеток — продуцентов TNF α и TNF α +IL-2 после стимуляции каждым из этих пептидов достоверно отличалось от клеток животных контрольной группы. После сублетальной инфекции количество этих клеток у иммунизированных мышей увеличилось в несколько раз по сравнению с контрольными животными. Причем, важно, что наряду с TNF α - и IL-2-продуцирующими клетками, увеличилось количество клеток IFN γ -продуцентов. Как показано в клинических исследованиях, именно секреция Т-клетками IFN γ имеет первостепенное значение в выздоровлении от инфекции [12, 22].

Предполагается, что экспансия CD4⁺ Т-клеток лежит в основе прайм-буст механизма действия вакцин. Кроме того, CD4⁺ клетки памяти необходимы для гетеросубтипического иммунного ответа [12, 22]. Вероятно, это один из ведущих механизмов кросс-реактивности вакцин, содержащими в качестве целевых белков консервативные вирусные пептиды. Главным преимуществом таких вакцин является их направленность на большинство субтипов вируса гриппа, что было продемонстрировано ранее [1, 7, 24]. В настоящей работе показано, что подобные вакцины, стимулируя образование анти-М2е и анти-НА2 специ-

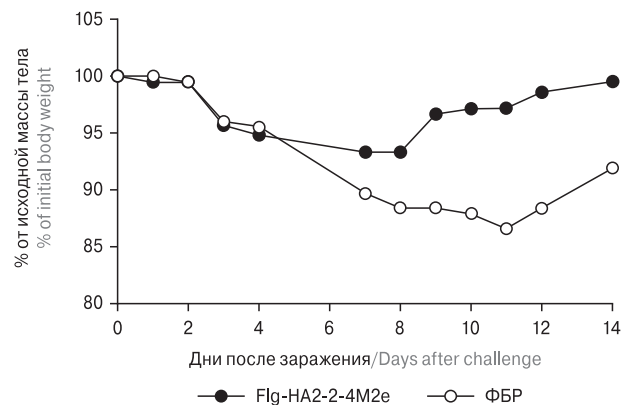


Рисунок 5. Динамика массы тела иммунизированных и неиммунизированных мышей после сублетального заражения вирусом A/Aichi/2/68

Figure 5. Dynamics of the body weight of mice post immunization and post challenge with virus A/Aichi/2/68

фических иммуноглобулинов и CD4⁺ Т-клеток, в том числе эффекторных клеток памяти, обладают праймирующим эффектом, который реализуется при последующей инфекции.

Благодарности

Авторы выражают благодарность Российскому научному фонду, при поддержке которого проводились данные исследования (Соглашение № 15-14-00043 от 19.05.2015 г.).

Список литературы/References

1. Степанова Л.А., Котляров Р.Ю., Шуклина М.А., Блохина Е.А., Сергеева М.В., Потапчук М.В., Ковалева А.А., Равин Н.В., Цыбалова Л.М. Влияние порядка присоединения фрагментов HA2 и M2е вирусов гриппа А к флагеллину на свойства рекомбинантных белков // *Acta Naturae*. 2018. Т. 10, № 1 (36). С. 90–100. [Stepanova L.A., Kotlyarov R.Ju., Shuklina M.A., Blohina E.A., Sergeeva M.V., Potapchuk M.V., Kovaleva A.A., Ravin N.V., Tsybalova L.M. Influence of the order of attachment of HA2 and M2e fragments of influenza A viruses to flagellin on the properties of recombinant proteins. *Acta Naturae*, 2018. vol. 10, no. 1 (36), pp. 90–100. (In Russ.)]
2. Atsmon J., Caraco Y., Ziv-Sefer S., Shaikevich D., Abramov E., Volokhov I., Bruzil S., Haima K.Y., Gottlieb T., Ben-Yedidia T. Priming by a novel universal influenza vaccine (Multimeric-001)-a gateway for improving immune response in the elderly population. *Vaccine*, 2014, vol. 32, no. 44, pp. 5816–5823. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.08.031
3. Bates J.T., Honko A.N., Graff A.H., Kock N., Mizel S.B. Mucosal adjuvant activity of flagellin in aged mice. *Mech. Ageing Dev.*, 2008, vol. 129, pp. 271–281. doi: 10.1016/j.mad.2008.01.009
4. Chen S., Zheng D., Li C., Zhang W., Xu W., Liu X., Fang F., Chen Z. Protection against multiple subtypes of influenza viruses by virus-like particle vaccines based on a hemagglutinin conserved epitope. *Biomed. Res. Int.*, 2015: 901817. doi: 10.1155/2015/901817
5. Cuadros C., Lopez-Hernandez F.G., Dominguez A.L., McClelland M., Lustgarten J. Flagellin fusion proteins as adjuvants or vaccines induce specific immune responses. *Infect. Immun.*, 2004, vol. 72, no. 5, pp. 2810–2816.
6. Cunningham A.F., Khan M., Ball J., Toellner K.M., Serre K., Mohr E. Responses to the soluble flagellar protein FliC are Th2, while those to FliC on Salmonella are Th1. *Eur. J. Immunol.*, 2004, vol. 34, pp. 2986–2995.
7. De Filette M., Martens W., Roose K., Deroo T., Vervalle F., Bentahir M., Vandekerckhove J., Fiers W., Saelens X. An influenza A vaccine based on tetrameric ectodomain of matrix protein 2. *J. Biol. Chem.*, 2008, vol. 283 (17), pp. 11382–11387. doi: 10.1074/jbc.M800650200
8. Delaney K.N., Phipps J.P., Johnson J.B., Mizel S.B. A recombinant flagellin-poxvirus fusion protein vaccine elicits complement-dependent protection against respiratory challenge with vaccinia virus in mice. *Viral Immunol.*, 2010, vol. 23, pp. 201–210. doi: 10.1089/vim.2009.0107
9. Deng L., Ibañez L.I., Van den Bossche V., Roose K., Youssef S.A., de Bruin A., Fiers W., Saelens X. Protection against influenza A virus challenge with M2e-displaying filamentous Escherichia coli phages. *PLoS One*, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0126650
10. El Bakkouri K., Descamps F., De Filette M., Smet A., Festjens E., Birkett A. Universal vaccine based on ectodomain of matrix protein 2 of influenza A: Fc receptors and alveolar macrophages mediate protection. *J. Immunol.*, 2011, vol. 186, pp. 1022–1031. doi: 10.4049/jimmunol.0902147

11. Eliasson D.G., Omokanye A., Schön K., Wenzel U.A., Bernasconi V., Bemark M., Kolpe A., El Bakkouri K., Ysenbaert T., Deng L., Fiers W., Saelens X., Lycke N. M2e tetramer-specific memory CD4 T cells are broadly protective against influenza infection. *Mucosal Immunol.*, 2017, vol. 11, pp. 273–289. doi: 10.1038/mi.2017.14
12. Epstein S.L., Lo C.Y., Misplon J.A., Lawson C.M., Hendrickson B.A., Max E.E., Subbarao K. Mechanisms of heterosubtypic immunity to lethal influenza A virus infection in fully immunocompetent, T cell-depleted, beta2-microglobulin-deficient, and J chain-deficient mice. *J. Immunol.*, 1997, vol. 158, no. 3, pp. 1222–1230.
13. Hazenbos W.L., Gessner J.E., Hofhuis F.M. Impaired IgG-dependent anaphylaxis and Arthus reaction in Fc gamma RIII (CD16) deficient mice. *Immunity*, 1996, vol. 5, pp. 181–188.
14. Jegerlehner A. Influenza A vaccine based on the extracellular domain of M2: weak protection mediated via antibody-dependent NK cell activity. *J. Immunol.*, 2004, vol. 172, pp. 5598–5605.
15. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, pp. 680–685.
16. McKinstry K.K., Strutt T.M., Kuang Yi, Brown D.M., Sell S., Dutton R.W., Swain S.L. Memory CD4+ T cells protect against influenza through multiple synergizing mechanisms. *J. Clin. Invest.*, 2012, vol. 122, no. 8, pp. 2847–2856. doi: 10.1172/JCI63689
17. Mozdzanovska K., Zharikova D., Cudic M., Otvos L., Gerhard W. Roles of adjuvant and route of vaccination in antibody response and protection engendered by a synthetic matrix protein 2-based influenza A virus vaccine in the mouse. *Virology J.*, 2007, vol. 4: 118.
18. Nimmerjahn F., Ravetch J.V. Divergent immunoglobulin G subclasses activity through selective Fc receptor binding. *Science*, 2005, vol. 310, pp. 1510–1512.
19. Scorza B.F., Tsvetnitsky V., Donnelly J.J. Universal influenza vaccines: Shifting to better vaccines. *Vaccine*, 2016, vol. 34, no. 26, pp. 2926–2933. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.03.085
20. Strutt T.M., McKinstry K.K., Dibble J.P., Winchell C., Kuang Y., Curtis J.D., Huston G., Dutton R.W., Swain S.L. Memory CD4+ T cells induce innate responses independently of pathogen. *Nat. Med.*, 2010, vol. 16, no. 5, pp. 558–564. doi: 10.1038/nm.2142
21. Sun K., Ye J., Perez D.R., Metzger D.W. Seasonal FluMist vaccination induces cross-reactive T cell immunity against H1N1 (2009) influenza and secondary bacterial infections. *J. Immunol.*, 2011, vol. 186, no. 2, pp. 987–993. doi: 10.4049/jimmunol.1002664
22. Swain S.L., McKinstry K.K., Strutt T.M. Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, vol. 12, no. 2, pp. 136–148. doi: 10.1038/nri3152
23. Tsybalova L.M., Stepanova L.A., Shuklina M.A., Mardanova E.S., Kotlyarov R.Y., Potapchuk M.V., Petrov S.A., Blokhina E.A., Ravin N.V. Combination of M2e peptide with stalk HA epitopes of influenza A virus enhances protective properties of recombinant vaccine. *PLoS One*, 2018, vol. 13, no. 8: e0201429. doi: 10.1371/journal.pone.0201429
24. Zebedee S.L., Lamb R.A. Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *J. Virol.*, 1988, vol. 62, no. 8, pp. 2762–2772.
25. Zens K.D., Farber D.L. Memory CD4 T cells in influenza. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2015, vol. 386, pp. 399–421. doi: 10.1007/82_2014_401
26. Zhong W., Reed C., Blair P.J., Katz J.M., Hancock K. Influenza Serology Working Group. Serum antibody response to matrix protein 2 following natural infection with 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus in humans. *J. Infect. Dis.*, 2014, vol. 209, no. 7, pp. 986–994. doi: 10.1093/infdis/jit811

Авторы:

Цыбалова Л.М., д.м.н., руководитель отдела вакцинологии, зав. лабораторией гриппозных вакцин, советник директора ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Степанова Л.А., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории гриппозных вакцин ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Коротков А.В., научный сотрудник лаборатории гриппозных вакцин ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Шуклина М.А., младший научный сотрудник лаборатории гриппозных вакцин ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Зайцева М.В., младший научный сотрудник лаборатории гриппозных вакцин ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Грищенко В.И., младший научный сотрудник лаборатории гриппозных вакцин ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Котляров Р.Ю., к.б.н., научный сотрудник отдела молекулярной биологии микроорганизмов отдела молекулярной биологии ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Tsybalova L.M., PhD, MD (Medicine), Head of the Department of Vaccinology, Head of the Laboratory of Influenza Vaccines, Advisor to the Director, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;

Stepanova L.A., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Influenza Vaccines, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;

Korotkov A.V., Researcher, Laboratory of Influenza Vaccines, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;

Shuklina M.A., Junior Researcher, Laboratory for Influenza Vaccines, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;

Zaitseva M.V., Junior Researcher, Laboratory of Influenza Vaccines, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;

Grishchenko V.I., Junior Researcher, Laboratory of Influenza Vaccines, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;

Kotlyarov R.Yu., PhD (Biology), Researcher, Department of Molecular Biology of Microorganisms, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 11.08.2018
Отправлена на доработку 21.03.2019
Принята к печати 30.05.2019

Received 11.08.2018
Revision received 21.03.2019
Accepted 30.05.2019

ВЫЯВЛЕНИЕ КЛЕТОК ПАМЯТИ У ЕЖЕГОДНО РЕВАКЦИНИРУЕМЫХ ДОНОРОВ ВАКЦИНОЙ СИБИРЕЯЗВЕННОЙ ЖИВОЙ

В.В. Фирстова, А.С. Карцева, М.В. Силкина, М.А. Марьин, Я.О. Мунтян,
А.К. Рябко, И.Г. Шемякин

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

Резюме. Вакцина сибиреязвенная живая сухая используется для проведения вакцинопрофилактики в России и странах ближнего зарубежья уже в течение нескольких десятилетий. В статье приведены данные об уровне антител к протективному антигену (ПА) и летальному фактору (ЛФ) у многократно вакцинированных доноров в ранние сроки (5–8 сутки) и через 1 месяц после плановой ревакцинации. Проанализировано наличие специфических клеток памяти в крови у доноров после предыдущих вакцинаций. У всех людей через 1 год после иммунизации живой сибиреязвенной вакциной сохраняются Т-лимфоциты памяти. Результаты исследований показали, что на 5–8 сутки после плановой ежегодной ревакцинации в крови у большинства доноров происходило нарастание эффекторных Т-клеток памяти с фенотипом CD3⁺CD45RO⁺CD62L⁻. Максимальное увеличение эффекторных Т-клеток памяти в крови наблюдали на 7 сутки, когда количество данной субпопуляции увеличивалось в 2 раза по сравнению с контрольной группой доноров. Количество центральных Т-лимфоцитов памяти в крови в ранние сроки после вакцинации не увеличивалось, но внутри этой субпопуляции возрастало количество активированных CD3⁺CD45RO⁺CD62L⁺HLA-DR⁺ центральных клеток памяти. Выявили также увеличение содержания активированных CD3⁺CD45RO⁺CD62L⁻HLA-DR⁺ клеток в субпопуляции эффекторных клеток памяти. У половины доноров на 5–8 сутки после плановой ежегодной ревакцинации в сыворотке крови были выявлены антитела класса IgG к ПА и у одного донора — к ЛФ. Быстрое нарастание IgG специфических иммуноглобулинов в крови свидетельствует о сохранении В-лимфоцитов памяти в крови доноров после предыдущей вакцинации. Достоверного увеличения количества CD19⁺CD27⁺ лимфоцитов памяти в крови людей после их вакцинации против сибирской язвы обнаружено не было, но прослеживалась тенденция к увеличению количества CD19⁺CD27⁺ клеток памяти в крови на 5–8 сутки после вакцинации против сибирской язвы. После вакцинации на 5–8 сутки иммуногенеза активировалась как субпопуляция Т-хелперов, так и субпопуляция цитотоксических лимфоцитов, на поверхности которых усиливалась экспрессия CD69 и/или CD25 молекул. Т-хелперы усиливали экспрессию преимущественно CD25 молекулы, что отражает их высокую пролиферативную активность, а цитотоксические лимфоциты — CD69 молекулу, появление которой свидетельствует об усилении функциональной активности клеток. Наличие антител к ПА коррелирует с защитой организма от сибиреязвенной инфекции, что подтверждено в ряде экспериментов на животных моделях. К сожалению, уровень антител к ПА в крови людей быстро снижается

Адрес для переписки:

Карцева Алена Сергеевна
142279, Россия, Московская область, Серпуховский район,
п. Оболенск, ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии.
Тел.: 8 (4967) 31-20-84. Факс: 8 (4967) 36-00-10.
E-mail: pinchuk@obolensk.org

Contacts:

Alena S. Kartseva
142279, Russian Federation, Moscow Region, Serpukhov District,
Obolensk, State Research Center of Applied Microbiology
and Biotechnology.
Phone: +7 (4967) 31-20-84. Fax: +7 (4967) 36-00-10.
E-mail: pinchuk@obolensk.org

Библиографическое описание:

Фирстова В.В., Карцева А.С., Силкина М.В., Марьин М.А.,
Мунтян Я.О., Рябко А.К., Шемякин И.Г. Выявление клеток памяти
у ежегодно ревакцинируемых доноров вакциной сибиреязвенной
живой // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 3–4. С. 495–503.
doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-495-503

Citation:

Firstova V.V., Kartseva A.S., Silkina M.V., Marin M.A., Muntian I.A.,
Ryabko A.K., Shemyakin I.G. Detecting specific memory T and B cells
in volunteers annually revaccinated with live anthrax vaccine // Russian
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9,
no. 3–4, pp. 495–503. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-495-503

после вакцинации. Выявленная нами способность В-лимфоцитов памяти быстро запускать синтез специфических антител в ответ на ревакцинацию позволяет предположить возможность оценки противосибирезвенного иммунитета по наличию В- и Т-клеток памяти в крови.

Ключевые слова: клетки памяти, сибирская язва, проточная цитометрия, вакцина, антитела, протективный антиген, летальный фактор.

DETECTING SPECIFIC MEMORY T AND B CELLS IN VOLUNTEERS ANNUALLY REVACCINATED WITH LIVE ANTHRAX VACCINE

Firstova V.V., Kartseva A.S., Silkina M.V., Marin M.A., Muntian Ia.O., Ryabko A.K., Shemyakin I.G.

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

Abstract. Currently, live anthrax vaccine has been used for vaccine prophylaxis in Russia and neighbor countries for several decades, but precise mechanism of post-vaccination protection mechanism remains unclear. Here, we provide data on examining serum antibody level against protective antigen (PA) and lethal factor (LF) in repeatedly vaccinated volunteers at early stage (5–8 days) and 1 month after the performing pre-scheduled annual revaccination. Amount of peripheral blood antigen-specific memory T cells after previous vaccinations was analyzed. It was showed that frequency of CD3⁺CD45RO⁺CD62L⁻ memory effector T cells was increased in the majority of volunteers on day 5–8 day after performing pre-scheduled annual revaccination that peaked at day 7 by elevating it by 2-fold compared with the control group. Percentage of anthrax-specific central memory T cells did not increase at early stage after vaccination, whereas amount of activated CD3⁺CD45RO⁺CD62L⁺HLA-DR⁺ subset within this memory T cell population was increased. Likewise, percentage of activated CD3⁺CD45RO⁺CD62L⁻HLA-DR⁺ effector memory T cell subset was also increased. Moreover, serum anti-PA IgG were detected on day 5–8 day after pre-scheduled annual revaccination in half of volunteers, whereas anti-LF IgG were found only in a single volunteer. Rapidly elevated amount of serum anthrax-specific IgG antibodies evidences about sustained memory B cell response in peripheral blood samples in volunteers after pre-scheduled annual revaccination. However, percentage of CD19⁺CD27⁺ memory B cells was not significantly elevated at early stage after revaccination that tended to increase. Both helper and cytotoxic T cell subsets were activated on day 5–8 after revaccination revealed by upregulated expression of CD69 and/or CD25 markers, with the latter predominantly found on helper T cells, thereby accounting for their high proliferative activity, whereas the former — on cytotoxic T cell subsets. Detection of anti-PA IgG antibodies correlates with protection against anthrax, which was confirmed in animal models. Unfortunately, the level of serum anti-PA IgG antibodies rapidly declines after vaccination. Ability of memory B cells to rapidly trigger production of anthrax-specific antibodies in response to revaccination suggests that anti-anthrax immunity may be evaluated by measuring frequency of peripheral blood anthrax-specific memory B and T cells.

Key words: memory cells, anthrax, flow cytometry, vaccine, antibodies, lethal toxin, protective antigen.

Введение

Сибирская язва относится к особо опасной инфекции, вызываемой грамположительными спорообразующими бактериями *Bacillus anthracis*. Для специфической профилактики сибирской язвы в России и странах ближнего зарубежья используют вакцину сибирезвенную живую сухую. Вакцинация живой сибирезвенной вакциной по профилактическим показаниям осуществляется ежегодно. После иммунизации вакциной сибирезвенной живой сухой у 13% людей специфические антитела не выявляются, и их уровень быстро падает: через 9 месяцев 95% вакцинированных являются серонегативными. Данные ретроспективного анализа показали, что после первой вакцинации против сибирской язвы положительный антраксиновый тест выявлялся у 89–90% людей, после двух-трех вакцинаций — у 87%, а после 4 и более — у 29–32% вакцинированных. В связи с этим возникает вопрос об эффективности многократной вакцинации [1].

В странах дальнего зарубежья для вакцинопрофилактики используют химические вакцины: адсорбированную вакцину AVA — anthrax vaccine absorbed — в США и странах Западной Европы, AVP — anthrax vaccine precipitated — в Англии. Оценку иммунологической эффективности вакцинации AVA или AVP вакцинами проводят на основании выявления антител к протективному антигену (ПА) и их способности нейтрализовать летальный фактор (ЛФ). После иммунизации AVA вакциной у 17,6% вакцинированных людей не выявляются IgG антитела к ПА в ИФА, а у 30,9% серопозитивных доноров сыворотки не способны нейтрализовать летальный токсин. Аналогичные данные получены после вакцинации AVP вакциной [5].

У переболевших сибирской язвой людей специфические антитела также долго не циркулируют в крови — максимум 18 месяцев, и преимущественно это антитела к ЛФ [3].

Ряд экспериментальных исследований, проведенных на животных, свидетельствует о важности роли и Т- и В-клеточного звеньев имму-

нитета. В частности, в экспериментах на мышах и приматах была выявлена прямая корреляция между наличием в сыворотке крови токсин-нейтрализующих антител и защитой животных от летального исхода при сибиреязвенной инфекции [16]. Кроме того, у всех выживших людей после террористической атаки в 2011 г. в США в сыворотке крови были обнаружены антитела к ПА [4].

Длительные наблюдения показали, что в эндемичных районах повторная реинфекция сибирской язвой людей не случается, если в их крови циркулируют специфические CD4⁺ Т-клетки памяти даже при отсутствии специфических антител в сыворотке крови [2]. Исследования на морских свинках показали, что для защиты от сибирской язвы достаточно наличия пула поствакцинальных/постинфекционных специфических CD4⁺ Т-клеток памяти [11].

При расчете сроков ревакцинации обычно выбирают усредненные данные и учитывают гетерогенность людей по силе иммунологических реакций. Это позволило нам предположить, что у части доноров через год после вакцинации еще сохраняются клетки памяти к антигенам *B. anthracis*. Основная ниша клеток памяти — костный мозг и лимфоидные органы. В крови специфические клетки памяти циркулируют постоянно, но в единичных количествах для возможности быстрого выявления патогена в случае его повторного проникновения в организм. При проникновении специфического антигена клетки памяти активируются и их количество увеличивается.

Цель исследования — выявить Т- и В-клетки памяти у ежегодно ревакцинируемых доноров вакциной сибиреязвенной живой.

Материалы и методы

Доноры. У 8 людей, иммунизированных вакциной сибиреязвенной живой сухой для подкожного и скарификационного применения (серия 265, Киров), на 5, 6, 7, 8 и 30 сутки брали цельную кровь в вакуумные пробирки Vacuette (Greiner Bio-One, Австрия) с лития гепарином и с активатором свертывания крови для получения сыворотки. Контрольная группа состояла из 15 доноров неиммунизированных и ранее не болевших сибирской язвой.

Выделение мононуклеарных клеток. Гепаринизированную кровь, разведенную в 2 раза фосфатно-солевым буфером (ФСБ) с 2% фетальной бычьей сывороткой (ФБС), наслаивали на градиент плотности Histopaque-1,077 (Sigma, США) в соотношении 1:1, центрифугировали в течении 30 мин при 400g при комнатной температуре. Отобранное опалесцирующее кольцо дважды отмывали при 250g в 10 мл ФСБ

с 2% ФБС. Осадок ресуспендировали в полной питательной среде RPMI 1640 (ПанЭко, Россия), содержащей 10% ФБС, 2 мМ глутамин (ПанЭко, Россия), 10 мМ HEPES (Sigma, США), 25 мкМ 2-меркаптоэтанола (Sigma, США). Жизнеспособность клеток определяли в тесте с трипановым синим. Концентрацию клеточной суспензии доводили до 5×10^6 клеток/мл с помощью автоматического счетчика TC-20 (Bio-Rad, США).

Фенотипирование лимфоцитов. Лимфоцитарную взвесь клеток (5×10^6 кл/мл) метили моноклональными антителами: для выявления субпопуляций Т-клеток — CD45RO-FITC, CD62L-APC, HLA-DR-PE, CD3-PerCP, CD4-PE, CD25-APC, CD69-FITC, для В-клеток — CD19-APC, CD138-FITC, CD27-PC5 (все производства eBioscience, США), в течение 20 мин в темноте при температуре 20°C в соответствии с инструкцией производителя. Затем клетки отмывали в ФСБ с 2% ФБС и фиксировали 1% раствором формалина. Цитометрический анализ проводили не позднее, чем через 24 ч. Образцы анализировали на проточном цитофлюориметре FACSAria III (Becton Dickinson, США) с использованием программного обеспечения BD FACSDiva (версия 8.0). В каждом образце анализировали 10 000 клеток.

Получение рекомбинантных антигенов. Нуклеотидные последовательности ПА и ЛФ были получены амплификацией соответствующих участков генома *B. anthracis* СТИ-1 (ГКПМ-Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ) парами праймеров, дополнительно содержащих сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции. Полученные фрагменты ДНК были верифицированы в вектор pET22(b)+ (Novagen, Merck, США) и экспрессированы в переплазматическое пространство *E. coli* BL21(DE3), а затем очищены металл-хелатной хроматографией с последующей гель-фильтрацией. Чистоту полученных рекомбинантных белков проверяли в электрофорезе в ПААГ в денатурирующих условиях по методу Лэммли. Гель окрашивали Кумасси бриллиантовым синим (R-250), молекулярную массу полученных полос сравнивали с коммерческим маркером молекулярных масс. Концентрацию определяли на спектрофотометре Smart Spec Plus (Bio-Rad, США) при длине волны 280 нм.

Определение антител к ПА и ЛФ в сыворотке крови. В лунки планшета вносили по 100 мкл раствора одного из антигенов в концентрации 0,1 мг/мл, инкубировали в течение 2 ч при температуре 37°C на орбитальном шейкере. По окончании инкубации проводили трехкратную отмывку лунок планшета ФСБ раствором, содержащим 0,05% Tween-20 (ФСБ-Т). Свободные валентности пластика блокировали 5% молоком. Блокировку проводили в течение

1 ч при температуре 37°C и перемешивании, после чего троекратно отмывали с использованием ФСБ-Т. Начиная с разведения 1:25 сыворотки крови вакцинированных людей, титровали с шагом в 2 раза. Далее инкубировали в течение 1 ч при температуре 37°C и перемешивании на шейкере, затем троекратно отмывали ФСБ-Т. Конъюгаты античеловеческих антител с пероксидазой хрена разводили 1:5000. После инкубирования в течении 40 мин при температуре 37°C планшеты шестикратно отмывали ФСБ-Т. Во все лунки вносили по 100 мкл субстрат-индикаторного раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензида. Положительную реакцию оценивали по появлению окрашивания раствора в синий цвет. Реакцию останавливали добавлением в лунки по 50 мкл 1 М серной кислоты. Учет результатов проводили на многофункциональном планшетном анализаторе Thermo Scientific Varioskan Flash (Thermo Scientific, США) при длине волны 450 нм. В качестве отрицательного контроля брали сыворотки доноров, невакцинированных против сибирской язвы и не болевших ранее сибиреязвенной инфекцией. Положительным контролем являлась сыворотка мышей линии Balb/c в разведении 1:1000. Положительным считали результат реакции в лунках, оптическая плотность в которых превышает показатели оптической плотности отрицательных контролей не менее чем в 2 раза.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку результатов выполняли с использованием пакета программ Excel

2013. Оценка достоверности различия сравниваемых величин проводилась по критерию Стьюдента (t) и уровню вероятности безошибочного прогноза (P). Цитометрический анализ разных образцов проводили по одинаковому протоколу настроек компенсации и напряжения. Статистический анализ проводили в программе BD FACS Diva (версия 8.0).

Результаты

Определение антител к ПА и ЛФ. У всех людей, вакцинированных 1 год назад против сибирской язвы в сыворотках крови не были выявлены антитела к ПА и ЛФ (данные не представлены). На 5–8 сутки после плановой ежегодной ревакцинации у четверых из восьми доноров в сыворотках крови были выявлены антитела к ПА. Все серопозитивные доноры были ранее многократно (10–20 раз) вакцинированы против сибирской язвы. Титры антител к ПА варьировали в пределах от 1:50 до 1:400. Серонегативные доноры иммунизировались вакциной живой сибиреязвенной сухой также многократно, а один из них во второй раз. Антитела к ЛФ были выявлены только у одного многократно вакцинированного донора, кровь которого взяли на исследование на 7 сутки после вакцинации (рис. 1).

На 30 сутки после иммунизации у всех доноров в сыворотке крови были выявлены антитела к ПА и у 6 из 8 — антитела к ЛФ. Уровень антител к ПА варьировал от 1:400 до 1600, к ЛФ — от 1:200 до 1:800 (рис. 2).

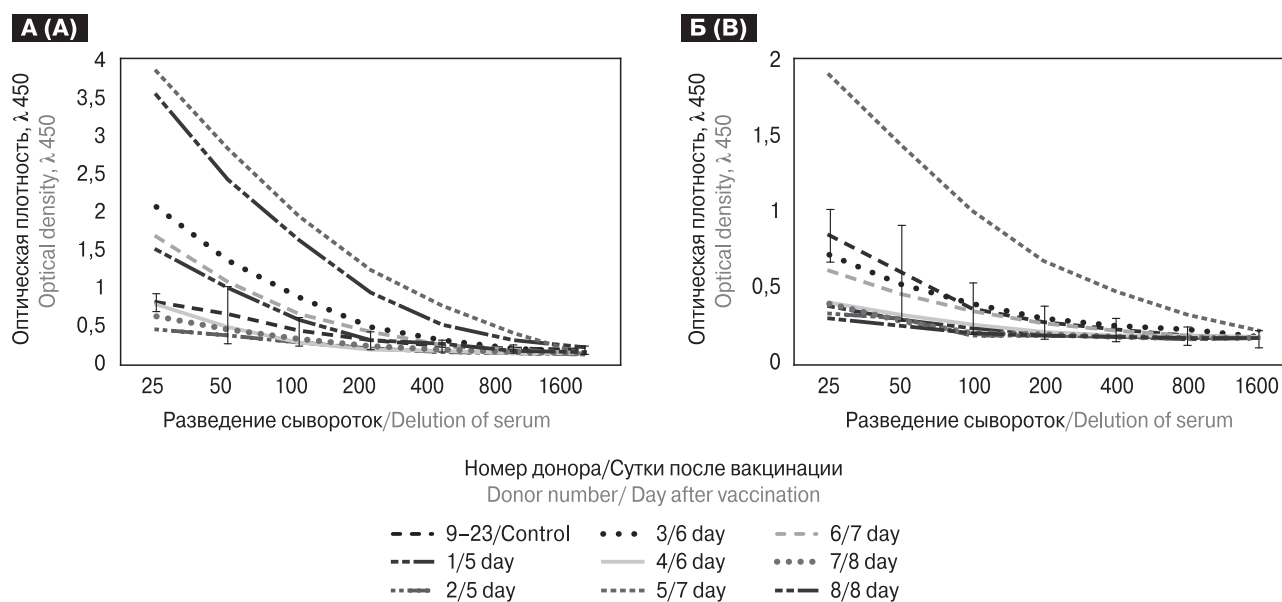


Рисунок 1. Титры антител IgG к протективному антигену (А) и летальному фактору (Б) в сыворотке крови доноров на 5–8 сутки после иммунизации вакциной сибиреязвенной живой сухой

Figure 1. Human serum IgG antibodies to protective antigen (A) and lethal factor (B) on 5–8 days after immunization with live anthrax vaccine

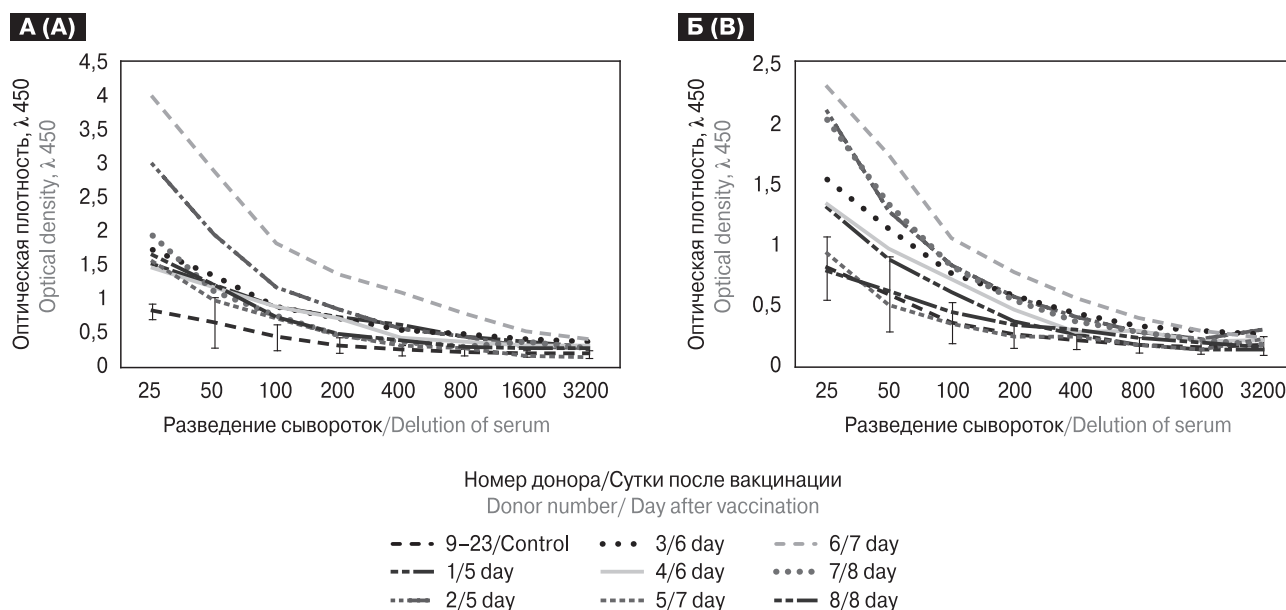


Рисунок 2. Титры антител IgG к протективному антигену (А) и летальному фактору (Б) в сыворотке крови доноров на 30 сутки после иммунизации вакциной живой сибиреязвенной сухой

Figure 2. Human serum IgG antibodies to protective antigen (A) and lethal factor (B) on the 30th day after immunization with live anthrax vaccine

Фенотипирование В-лимфоцитов. Процентное содержание CD19⁺ В-лимфоцитов в мононуклеарной фракции крови доноров на 5–8 сутки после иммунизации вакциной сибиреязвенной живой сухой достоверно не отличалось от значений в контрольной группе доноров и колебалось в диапазоне от 6,1 до 9,5% (табл.). Внутри популяции В-лимфоцитов содержание клеток памяти с фенотипом CD19⁺CD27⁺ у контрольных

доноров варьировало в пределах от 18,5 до 28,6%. На 6–7 сутки после иммунизации против сибирской язвы у вакцинированных доноров отмечалась тенденция к увеличению CD19⁺CD27⁺ субпопуляции (рис. 3).

Процентное содержание CD19⁺CD138⁺ плазматических клеток у доноров контрольной группы колебалось в диапазоне от 0,6 до 1,7%. Мы не обнаружили достоверного увеличения

Таблица. Процентное содержание В-лимфоцитов и субпопуляций Т-лимфоцитов в периферической крови людей на 5–8 сутки после иммунизации вакциной сибиреязвенной живой сухой

Table. The percentage of B-lymphocytes and subpopulations of T-lymphocytes in the peripheral blood of people 5–8 days after immunization with live anthrax vaccine

Срок после иммунизации, сутки Period after immunization, day	Контроль Control	5		6		7		8	
Номер донора Donor number	9–23	1	2	3	4	5	6	7	8
CD19 ⁺	6,6–10,1	6,1	7,5	9,5	6,7	6,2	7,8	7,0	8,2
CD19 ⁺ CD27 ⁺	18,5–28,6	20,9	25,3	43,5	38,5	36,4	41,2	29	34,5
CD19 ⁺ CD138 ⁺	0,6–1,7	4,3	3,0	2,5	2,6	0,9	2,6	1,1	1,6
CD3 ⁺	54,5–63,7	63,7	69,2	69,2	64,1	60,4	69,2	76,4	61,7
CD3 ⁺ CD4 ⁺	28,2–49,3	56,1	57,7	42,1	34,9	46,6	35,8	48,8	46,9
CD3 ⁺ CD8 ⁺	9,6–19,4	18	18	28,5	24,1	16,4	33,6	31,2	15,4
CD3 ⁺ CD45RO ⁺ CD62L ⁻	8,1–12,0	11,8	17,5	13,9	14,5	25,4	24,1	15,7	16,9
CD3 ⁺ CD45RO ⁺ CD62L ⁺ HLA-DR ⁺	2,5–14,5	10,9	7,8	10,3	9,4	15,1	12,6	14,1	16,2
CD3 ⁺ CD45RO ⁺ CD62L ⁺	7,0–34,2	28,6	34,1	21,2	25,8	24	50,3	13,8	37,8
CD3 ⁺ CD45RO ⁺ CD62L ⁺ HLA-DR ⁺	3,5–15,0	11,6	14	16	7,7	4,4	13,5	6,2	6,7
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD69 ⁺	0,2–0,8	0,2	0,8	0,9	1,9	1,4	6,8	0,3	1,5
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	1,6–3,1	7,3	3,5	3,9	7,4	6,2	3,9	11	6
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD69 ⁺	0,3–1,8	3,8	3,2	3,9	4,3	5,7	4,3	0,5	3,1
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺	0,2–0,6	2,6	1,4	0,5	1,1	1,6	1,8	0,6	0,5

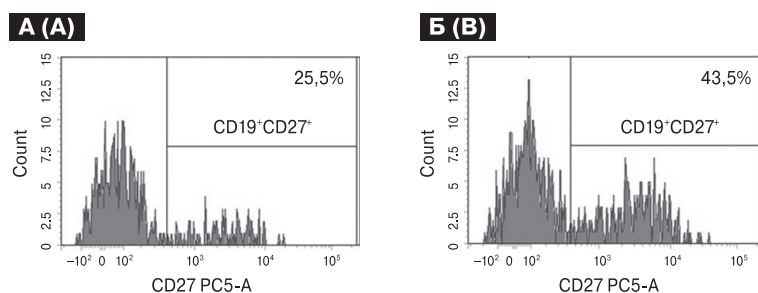


Рисунок 3. Пример однопараметрических цитофлюорограмм, отражающих процентное содержание CD19⁺CD27⁺ лимфоцитов в крови донора контрольной группы (А) и вакцинированного донора (Б) на 6 сутки после иммунизации вакциной сибиреязвенной живой сухой

Figure 3. Example of one-parameter cytofluorograms reflecting the percentage of CD19⁺ CD27⁺ lymphocytes in the blood of the donor of the control group (A) and the vaccinated donor (B) on the 6th day after immunization with the live anthrax vaccine

плазматических клеток в крови после вакцинации. Только у одного донора на 5 сутки количество CD19⁺CD138⁺ клеток увеличивалось до 4,3% (рис. 4).

Фенотипирование Т-клеток памяти. На основании дифференциальной оценки экспрессии CD45RO и CD62L молекул Т-клетки человека делят на эффекторные и центральные клетки памяти с фенотипами CD3⁺CD45RO⁺CD62L⁻ и CD3⁺CD45RO⁺CD62L⁺ соответственно [14]. Многопараметрический цитофлюорометрический анализ показал, что на 7 сутки после вакцинации в крови у доноров отмечалось увеличение более чем в 2 раза эффекторных Т-клеток памяти. По экспрессии маркера поздней активации — HLA-DR — судили об активации эффекторных и центральных Т-клеток памяти. Полученные данные показали увеличение субпопуляций активированных центральных Т-клеток памяти (CD3⁺CD45RO⁺CD62L⁺HLA-DR⁺) и эффекторных Т-клеток памяти (CD3⁺CD45RO⁺CD62L⁻HLA-DR⁺) с 5 по 8 сутки после вакцинации в 2 раза и более по сравнению с контролем (рис. 5).

Выявление активированных цитотоксических лимфоцитов и Т-хелперов. По экспрессии молекул CD69 и CD25 определяли количество активированных клеток в субпопуляциях Т-хелперов и цитотоксических лимфоцитов. Во все сроки исследований после вакцинации в крови было выявлено увеличенное количество CD3⁺CD4⁺CD25⁺ Т-хелперов и у некоторых доноров незначительное превышение содержания CD3⁺CD4⁺CD69⁺ относительно данных контрольной группы. В субпопуляции цитотоксических лимфоцитов наблюдали увеличение CD3⁺CD8⁺CD69⁺ клеток и менее выраженное нарастание CD3⁺CD8⁺CD25⁺ лимфоцитов (табл.).

Обсуждение

Одними из ключевых факторов, обуславливающих иммунопатогенез сибирской язвы, являются ПА и ЛФ — субъективные бинарного летального токсина. Летальный токсин сибирской язвы ингибирует формирование первичных реакций врожденного иммунитета, тем са-

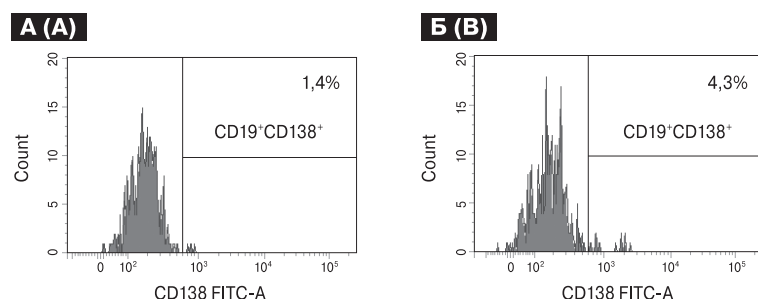


Рисунок 4. Пример однопараметрических цитофлюорограмм, отражающих процентное содержание CD19⁺CD138⁺ лимфоцитов в крови донора контрольной группы (А) и вакцинированного донора (Б) на 5 сутки после иммунизации вакциной сибиреязвенной живой сухой

Figure 4. Example of one-parameter cytofluorograms reflecting the percentage of CD19⁺CD138⁺ lymphocytes in the blood of the donor of the control group (A) and the vaccinated donor (B) on the 5th day after immunization with the live anthrax vaccine

мым нарушая формирование иммунного ответа. В присутствии летального токсина нарушаются презентация антигена, передачи сигналов Т-клеток и В-клеток, блокируется их пролиферация, запускается апоптоз макрофагов и дендритных клеток. Активация Т-лимфоцитов связана с появлением CD69 и CD25 рецепторов на поверхности клеток. Бактерии *B. anthracis* за счет синтеза ПА и ЛФ ингибируют экспрессию активационных маркеров на поверхности В- и Т-лимфоцитов [12, 6].

Результаты наших исследований показали, что после вакцинации на 5–8 сутки иммуногенеза активируются как субпопуляция Т-хелперов, так и субпопуляция цитотоксических лимфоцитов на поверхности которых усиливается экспрессия CD69 и/или CD25 молекул. Т-хелперы усиливали экспрессию преимущественно CD25 молекулы, что отражает их высокую пролиферативную активность, а цитотоксические лимфоциты — CD69 молекулы, появление которой свидетельствует об усилении функциональной активности клеток. Важность участия Т-лимфоцитарного звена в защите от сибиреязвенной инфекции показана в экспериментах на мышах, у которых спо-

собность Т-лимфоцитов синтезировать $IFN\gamma$ CD4⁺-клетками под влиянием инактивированных спор *B. anthracis* коррелировала с защитой от сибиреязвенной инфекции даже в отсутствии антител [8]. Появление активированных Т-лимфоцитов в крови доноров в ответ на вакцинацию отражает формирование сибиреязвенного иммунитета, способного обеспечить защиту от последующего заражения [6, 9].

Присутствие Т-клеток, способных быстро активироваться под влиянием антигенов *B. anthracis*, свидетельствует о наличии клеток памяти. Мы попытались выявить увеличение количества клеток памяти и/или усиление ими экспрессии маркеров активации в крови у людей на 5–8 сутки после иммунизации вакциной живой сибиреязвенной сухой. Начиная с 7 суток после вакцинации в крови доноров нарастало количество эффекторных клеток памяти (CD3⁺CD45RO⁺CD62L⁻), которые являются ключевыми в формировании и обеспечении стремительного защитного иммунитета. Распространяясь через кровяное русло по всему организму после проникновения специфического для них антигена, эффекторные Т-клетки памяти регулируют направленность иммунных

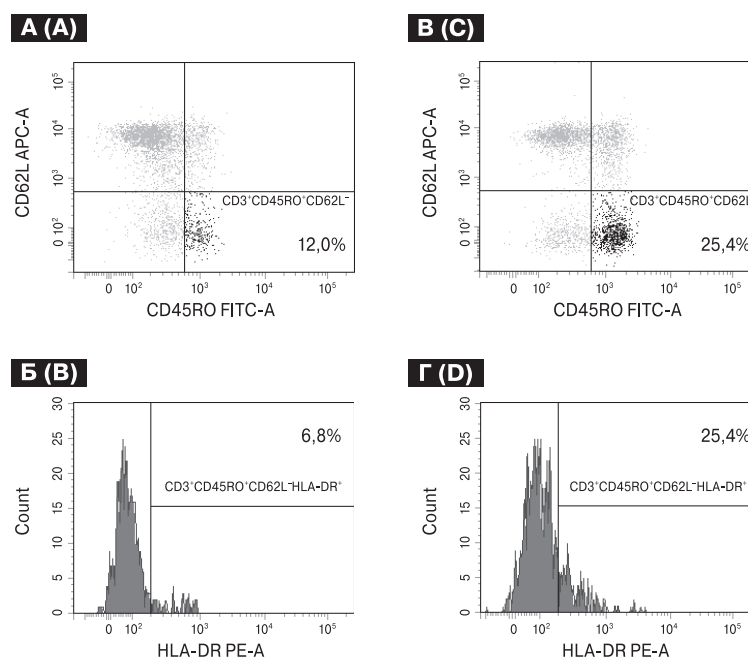


Рисунок 5. Примеры цитофлюорограмм, отражающих процентное содержание эффекторных клеток памяти в периферической крови у донора контрольной группы (А, Б) и донора на 7 сутки после иммунизации (В, Г)

Figure 5. Examples of cytofluorograms reflecting the percentage of memory effector cells in the peripheral blood of the donor of the control group (A, B) and the donor on the 7th day after immunization (C, D)

Примечание. А, Б — гистограммы распределения эффекторных клеток памяти и процент активированных внутри субпопуляции CD3⁺CD45RO⁺CD62L⁻HLA-DR⁺ лимфоцитов у донора контрольной группы; В, Г — у донора после иммунизации.

Note. A, B — histograms of the distribution of memory effector cells and the percentage of activated within the subpopulation of CD3⁺CD45RO⁺CD62L⁻HLA-DR⁺ lymphocytes from the donor of the control group; C, D — in the donor after immunization.

реакций, синтезируя соответствующие цитокины. Количество центральных клеток памяти при проникновении специфического антигена может увеличиваться в лимфоидных органах, но основная их функция состоит в активации и усилении пролиферации пула эффекторных клеток памяти. Вероятно, поэтому мы не увидели увеличения в крови количества центральных клеток памяти, но обнаружили увеличение количества среди них активированных клеток, что свидетельствует о взаимодействии со специфическим для них антигеном.

Далее мы попытались выявить В-клетки памяти в крови вакцинированных доноров. По своему фенотипу и функциям В-лимфоциты гетерогенны. Наивные В-лимфоциты экспрессируют CD19 и не экспрессируют CD27 молекулу. После активации В-лимфоциты проходят антигенную дифференцировку и начинают экспрессировать CD27 молекулу. Мы не выявили достоверного увеличения количества CD19⁺CD27⁺ лимфоцитов в крови людей после их вакцинации против сибирской язвы, но обнаружили тенденцию к увеличению количества В-лимфоцитов памяти в крови. Мы пытались обнаружить увеличение плазматических клеток в кровотоке. Плазматические клетки, синтезирующие антитела, являются терминальной стадией дифференцировки В-лимфоцитов. Их основное место пребывания — костный мозг и лимфоидные органы. В крови их содержание не превышает 1,5%, и их количество может увеличиваться только транзиторно при миграции в лимфоидные органы и ткани. Плазматические клетки экспрессируют CD138 молекулу (синдекана-1) [13]. В наших исследованиях в изучаемые сроки достоверного увеличения плазматических клеток в крови выявлено не было за исключением одного донора на 5 сутки после вакцинации.

Иммуноферментный анализ сывороток на 5–8 сутки после вакцинации позволил выявить у 4 из 8 вакцинированных доноров IgG антитела к ПА и у одного донора — к ЛФ. Появление антител класса IgG через 5 суток после вакци-

нации свидетельствует о сохранении В-клеток памяти. При наличии В-клеток памяти или плазматических клеток памяти IgG антитела выявляются в сыворотке крови уже на 4–5 день после проникновения специфического антигена, тогда как при первичном попадании антигена в организм необходимо 7–10 дней для детектируемого накопления специфических антител IgG в крови человека [7].

Протективный антиген и ЛФ являются Т-зависимыми антигенами. Можно предположить, что при наличии антител организм будет защищен от сибиреязвенной инфекции даже без участия Т-лимфоцитов, что было показано в экспериментах на животных [10, 16]. Если антитела в сыворотке крови не выявляются, но имеются В-клетки памяти, то для их активации необходимо участие Т-хелперов, которые должны презентировать антиген. А учитывая, что ПА и ЛФ ингибируют активацию Т-клеток, необходимо наличие Т-лимфоцитов памяти, способных активироваться под влиянием антигенов *B. anthracis* и презентировать антигены В-лимфоцитам.

Таким образом, в наших исследованиях было показано, что у всех людей через 1 год после иммунизации живой сибиреязвенной вакциной сохраняются Т-лимфоциты памяти. У четверых из 8 вакцинированных доноров в сыворотке крови обнаруживали антитела к ПА, начиная с 5 суток после вакцинации, что позволяет предположить о сохранении в организме В-лимфоцитов памяти, оставшихся после предыдущей вакцинации. Наличие антител к ПА коррелирует с защитой организма от сибиреязвенной инфекции, что подтверждено в ряде экспериментов на животных моделях. К сожалению, уровень антител к ПА в крови людей быстро снижается после вакцинации. Выявленная нами способность В-лимфоцитов памяти быстро запускать синтез специфических антител в ответ на ревакцинацию позволяет предположить возможность оценки противосибиреязвенного иммунитета по наличию В- и Т-клеток памяти в крови.

Список литературы/References

1. Маринин Л.И., Дятлов И.А., Мокриевич А.Н., Бахтеева И.В., Белова Е.В., Борзилов А.И., Комбарова Т.И., Кравченко Т.Б., Миронова Р.И., Попова В.М., Сомов А.Н., Титарева Г.М., Тюрин Е.А., Чекан Л.В., Шишкина О.Б., Шишкова Н.А. Методы изучения биологических свойств возбудителя сибирской язвы. М.: ЗАО МП «Гигиена», 2009. 304 с. [Marinin L.I., Dyatlov I.A., Mokrievich A.N., Bakhteeva I.V., Belova E.V., Borzilov A.I., Kombarova T.I., Kravchenko T.B., Mironova R.I., Popova V.M., Somov A.N., Titareva G.M., Tyurin E.A., Chekan L.V., Shishkina O.B., Shishkova N.A. Methods for studying the biological properties of the causative agent of anthrax. Moscow: ZAO MP «Hygiene», 2009. 304 p. (In Russ.)]
2. Ascough S., Ingram R.J., Chu K.K., Reynolds C.J., Musson J.A., Doganay M., Metan G., Ozkul Y., Baillie L., Sriskandan Sh., Moore St., Gallagher T.B., Dyson H., Williamson E.D., Robinson J.H., Maillere B., Boyton R.J., Altmann D.M. Anthrax lethal factor as an immune target in humans and transgenic mice and the impact of HLA polymorphism on CD4⁺ T cell immunity. *PLoS Pathog.*, 2014, vol. 10, no. 5: e1004085. doi: 10.1371/journal.ppat.1004085
3. Brenneman K.E., Doganay M., Akmal A., Goldman S., Galloway D.R., Mateczun A.J., Cross A.S., Baillie L.W. The early humoral immune response to Bacillus anthracis toxins in patients infected with cutaneous anthrax. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2011, vol. 62, no. 2, pp. 164–72. doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00800.x.

4. Bush L.M., Perez M.T. The anthrax attacks 10 years later. *Ann. Intern. Med.*, 2012, vol. 156, no. 1, pp. 41–45. doi: 10.7326/0003-4819-155-12-201112200-00373
5. Dumas E.K., Gross T., Larabee J., Pate L., Cuthbertson H., Charlton S., Hallis B., Engler R., Collins L.C., Spooner C.E., Chen H., Ballard J., James J.A., Farris A. Anthrax vaccine precipitated induces edema toxin-neutralizing, edema factor-specific antibodies in human recipients. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2017, vol. 24, no. 11: e00165-17. doi: 10.1128/cvi.00165-17
6. Fang H., Cordoba-Rodriguez R., Lankford C.S.R., Frucht D.M. Anthrax lethal toxin blocks MAPK kinase-dependent IL-2 production in CD4+ T Cells. *J. Immunol.*, 2015, vol. 174, no. 8, pp. 4966–4971. doi: 10.4049/jimmunol.174.8.4966
7. Garman L., Smith K., Farris A., Nelson M., Engler R., James J. Protective antigen-specific memory B cells persist years after anthrax vaccination and correlate with humoral immunity. *Toxins*, 2014, vol. 6, no. 8, pp. 2424–2431. doi: 10.3390/toxins6082424
8. Glomski I.J., Corre J.-P., Mock M., Goossens P.L. Cutting edge: IFN-producing CD4 T lymphocytes mediate spore-induced immunity to capsulated *Bacillus anthracis*. *J. Immunol.*, 2007, vol. 178, no. 5, pp. 2646–2650. doi: 10.4049/jimmunol.178.5.2646
9. Kachura M.A., Hickie C., Kell S.A., Sathe A., Calacsan C., Kiwan R., Hall B., Milley R., Ott G., Coffman R.L., Kanzler H., Campbell J.D. A CpG-ficolin nanoparticle adjuvant for anthrax protective antigen enhances immunogenicity and provides single-immunization protection against inhaled anthrax in monkeys. *J. Immunol.*, 2015, vol. 196, no. 1, pp. 284–297. doi: 10.4049/jimmunol.1501903
10. Kobiler D., Gozes Y., Rosenberg H., Marcus D., Reuveny S., Altboum Z. Efficiency of protection of guinea pigs against infection with *Bacillus anthracis* spores by passive immunization. *Infect. Immun.*, 2002, vol. 70, no. 2, pp. 544–560. doi: 10.1128/iai.70.2.544-550.2002
11. Marcus H., Danieli R., Epstein E., Velan B., Shafferman A., Reuveny S. Contribution of immunological memory to protective immunity conferred by a *Bacillus anthracis* protective antigen-based vaccine. *Infect. Immun.*, 2004, vol. 72, no. 6, pp. 3471–3477. doi: 10.1128/IAI.72.6.3471-3477.2004
12. Paccani S.R., Tonello F., Ghittoni R., Natale M., Muraro L., D’Elios M.M., Tang W.J., Montecucco C., Baldari C.T. Anthrax toxins suppress T lymphocyte activation by disrupting antigen receptor signaling. *J. Exp. Med.*, 2005, vol. 201, no. 3, pp. 325–331. doi: 10.1084/jem.20041557
13. Pauli N.T., Henry Dunand C.J., Wilson P.C. Exploiting human memory B cell heterogeneity for improved vaccine efficacy. *Front. Immunol.*, 2011, vol. 2. doi: 10.3389/fimmu.2011.00077
14. Segundo D.S., Fernandez-Fresnedo G., Gago M., Beares I., Ruiz-Criado J., Gonzalez M., Ruiz-Criado J., Gonzalez M., Ruiz J.C., Gomez-Alamillo C., Lopez-Hoyos M., Arias M. Kidney transplant recipients show an increase in the ratio of T-cell effector memory/central memory as compared to nontransplant recipients on the waiting list. *Transplant. Proc.*, 2010, vol. 42, no. 8, pp. 2877–2879. doi: 10.1016/j.transproceed.2010.07.072
15. Sim B.K.L., Li M., Osorio M., Wu Y., Wai T.T., Peterson J.W., James E.R., Chakravarty S., Gao L., Xu R., Kc N., Stafford R.E., Lawrence W.S., Yeager L.A., Peel J.E., Sivasubramani S.K., Chopra A.K., Filippova S., Hoffman S.L. Protection against inhalation anthrax by immunization with *Salmonella enterica* serovar Typhi Ty21a stably producing protective antigen of *Bacillus anthracis*. *NPJ Vaccines*, 2017, vol. 2, no. 1, pp. 1–7. doi: 10.1038/s41541-017-0018-4
16. Wild M.A., Xin H., Maruyama T., Nolan M.J., Calvey P.M., Malone J.D., Wallance M.R., Bowdish K.S. Human antibodies from immunized donors are protective against anthrax toxin in vivo. *Nat. Biotechnol.*, 2003, vol. 21, no. 11, pp. 1305–1306. doi: 10.1038/nbt89

Авторы:

Фирстова В.В., д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия;
Карцева А.С., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия;
Силкина М.В., стажер-исследователь лаборатории молекулярной биологии ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия;
Марин М.А., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия;
Мунтян Я.О., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия;
Рябко А.К., научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия;
Шемякин И.Г., д.б.н., профессор, зам. директора по научной работе ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия.

Authors:

Firstova V.V., PhD, MD (Biology), Head Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;
Kartseva A.S., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;
Silkina M.V., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;
Marin M.A., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;
Muntian I.O., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;
Ryabko A.K., Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;
Shemyakin I.G., PhD, MD (Biology), Professor, Deputy Director of Science, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 11.12.2018
 Принята к печати 13.03.2019

Received 11.12.2018
 Accepted 13.03.2019

СОСТАВ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА И ПОПУЛЯЦИЙ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ Th-КЛЕТОК У ПАЦИЕНТОВ С РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ

И.Н. Абдурасулова^{1,2}, Е.А. Тарасова¹, И.В. Кудрявцев^{1,3}, И.Г. Негореева⁴,
А.Г. Ильвес⁴, М.К. Серебрякова¹, Е.И. Ермоленко^{1,5}, Е.В. Ивашкова⁴,
А.В. Мацулевич¹, А.Е. Татарин¹, И.Д. Столяров⁴, В.М. Клименко¹,
А.Н. Суворов^{1,5}

¹ ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

² ГБОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

³ ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБУН Институт мозга человека им. Н.П. Бехтерева РАН, Санкт-Петербург, Россия

⁵ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В настоящее время роль микробиоты кишечника активно изучается при многих заболеваниях центральной нервной системы (ЦНС), в том числе при рассеянном склерозе (РС). В патогенезе РС ключевую роль играют аутореактивные к антигенам миелина CD4⁺ Th1- и Th17-клетки. Учитывая патогенетические особенности рассматриваемого аутоиммунного заболевания в данном исследовании уделено внимание анализу связи микробиоценоза кишечника с различными субпопуляциями Th-клеток. Цель исследования — оценить уровни отдельных представителей микробиоты кишечника у пациентов с РС и сопоставить их с уровнем циркулирующих в крови субпопуляций Th. В исследовании у 112 (72 женщины и 40 мужчин) пациентов с РС разной тяжести и длительности заболевания бактериологическим методом и с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени оценен уровень симбиотических и оппортунистических видов микроорганизмов. Субпопуляции Th-клеток (Th1, Th2, Th17, Th1/Th17, Th17/Th22, DP Th17), различающиеся набором хемокиновых рецепторов, определяли методом проточной цитофлуориметрии. Показана связь отдельных представителей микробиоты кишечника с тяжестью, длительностью и скоростью прогрессирования заболевания, а также с фенотипами иммунных клеток. Наибольшая связь уровня циркулирующих иммунных клеток наблюдалась с уровнем *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. и *Enterobacter* spp., причем действие *Enterococcus* spp. на субпопуляции Th клеток было синергично с действием *Enterobacter* spp. и антагонистично с *Lactobacillus* spp. Мы предполагаем, что выявление механизмов прямого и опосредованного влияния микробиоты на иммунную систему в дальнейшем будет способствовать разработке принципиально новых стратегий терапии РС.

Ключевые слова: рассеянный склероз, экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит, дисбиоз, кишечная микробиота, иммунорегуляция, T-хелперы, DP Th17.

Адрес для переписки:

Абдурасулова Ирина Николаевна
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12,
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.
Тел.: 8 (812) 234-94-75 (служебн.).
E-mail: i_abdurasulova@mail.ru

Contacts:

Irina N. Abdurasulova
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Akademika Pavlova str., 12,
Scientific Research Institute of Experimental Medicine.
Phone: +7 (812) 234-94-75 (office).
E-mail: i_abdurasulova@mail.ru

Библиографическое описание:

Абдурасулова И.Н., Тарасова Е.А., Кудрявцев И.В., Негореева И.Г.,
Ильвес А.Г., Серебрякова М.К., Ермоленко Е.И., Ивашкова Е.В.,
Мацулевич А.В., Татарин А.Е., Столяров И.Д., Клименко В.М.,
Суворов А.Н. Состав микробиоты кишечника и популяций
циркулирующих Th-клеток у пациентов с рассеянным
склерозом // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 3–4. С. 504–522.
doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-504-522

© Абдурасулова И.Н. и соавт., 2019

Citation:

Abdurasulova I.N., Tarasova E.A., Kudryavtsev I.V., Negoreeva I.G., Ilves A.G.,
Serebryakova M.K., Ermolenko E.I., Ivashkova E.V., Matsulevich A.V.,
Tatarinov A.E., Stoliarov I.D., Klimenko V.M., Suvorov A.N. Intestinal
microbiota composition and peripheral blood Th cell subsets in patients with
multiple sclerosis// Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya
i immunitet, 2019, vol. 9, no. 3–4, pp. 504–522. doi: 10.15789/2220-7619-
2019-3-4-504-522

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2019-3-4-504-522>

INTESTINAL MICROBIOTA COMPOSITION AND PERIPHERAL BLOOD Th CELL SUBSETS IN PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS

Abdurasulova I.N.^{a,b}, Tarasova E.A.^a, Kudryavtsev I.V.^{a,c}, Negoreeva I.G.^d, Ilves A.G.^d, Serebryakova M.K.^a, Ermolenko E.I.^{a,e}, Ivashkova E.V.^d, Matsulevich A.V.^a, Tatarinov A.E.^a, Stoliarov I.D.^d, Klimentko V.M.^a, Suvorov A.N.^{a,e}

^a Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

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

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

^d Institute of the Human Brain RAS, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. At present, the role of intestinal microbiota in diverse diseases of the central nervous system, including of multiple sclerosis (MS) has been extensively investigated. Self-reactive CD4⁺ Th1 and Th17 cells specific to myelin-derived antigens play a key role in the MS pathogenesis. Taking into consideration pathogenetic features related to MS development, we examined a relation between intestinal microbiocenosis and abundance of various peripheral blood helper T (Th) cell subsets in MS patients. Objective of the study: to assess prevalence of individual members of the intestinal microbiota in MS patients and analyze a relation with peripheral blood Th cell subsets. Prevalence of symbiotic and opportunistic microbial species was estimated by bacteriological method and real time PCR in 112 MS patients (72 females, 40 males) of varying severity and duration. Th cell subsets (Th1, Th2, Th17, Th1/Th17, Th17/Th22, DP Th17) were analyzed by using multi-color flow cytometry based on Th cell subset-specific surface expression of chemokine receptors. A relationship between individual intestinal microbiota species and severity, duration and rate of MS progression, as well as with the phenotype of immune cells was assessed. It was found that the most significant correlation between percentage of peripheral blood Th cell subsets was observed with prevalence of *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. and *Enterobacter* spp. Moreover, prevalence of *Enterococcus* spp. Th cell composition influenced synergistically or antagonistically together with *Enterobacter* spp. or *Lactobacillus* spp., respectively. It is suggested that direct and indirect impact of intestinal microbiota composition on human immune system might contribute to developing novel strategies for treating MS.

Key words: multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalomyelitis, dysbiosis, intestinal microbiota, immunoregulation, Th cell, DP Th17.

Введение

Рассеянный склероз (РС) является аутоиммунным демиелинизирующим заболеванием центральной нервной системы (ЦНС), поражающим людей трудоспособного возраста. В патогенезе РС ключевую роль играют аутореактивные к антигенам миелина CD4⁺ Th1- и Th17-клетки [25, 55]. В норме Th1 обеспечивают защиту от внутриклеточных бактерий и вирусов, а Th17-клетки — представляет первую линию защиты организма от внеклеточных патогенов (бактерий и грибов) [11], однако при их дисрегуляции отмечаются различные иммунопатологические состояния.

После того как было выяснено, что для запуска экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ) — модели РС у животных — требуется интерлейкин (IL)-23, а не IL-12 [27], было высказано предположение о большей патогенной роли при РС именно Th17-клеток. Th17-клетки присутствуют в очагах воспаления в ЦНС пациентов с РС [59], их количество увеличивается в крови и ликворе пациентов с активным РС, а также при рецидивах [31], напротив, супрессия их дифференцировки у животных ослабляет тяжесть ЭАЭ [43, 78]. Существуют данные о том, что основным патогенетическим звеном при ЭАЭ/РС являются Th17-клетки, продуцирующие цитокины семейства IL-17 [21, 45, 73], и сообщения о роли IL-6, TNF α , IL-21, IL-22 и GM-CSF в развитии РС [52].

Th17 — гетерогенная популяция клеток, различающаяся продуцируемыми цитокинами семейства IL-17 и поверхностными рецепторами. [52]. Кроме характерного рецептора CCR6, Th17-клетки экспрессируют на своей поверхности другие хемокиновые рецепторы, по комбинации которых они классифицируются на 4 субпопуляции [51].

В настоящее время, кроме классических Th17 (CCR6⁺CCR4⁺CXCR3⁻), выделяют также неклассические клетки Th1/Th17 или Th17.1 (CCR6⁺CCR4⁻CXCR3⁺), которые способны продуцировать одновременно IL-17A и IFN γ [75]. Большинство функциональных характеристик Th17-клеток обладают также клетки с фенотипом CCR6⁺CCR4⁺CXCR3⁺, получившие название «дважды позитивных» или DP Th17. Эти клетки имеют свойства одновременно Th17- и Th1-клеток, хотя их способность к продукции IFN γ и GM-CSF существенно ниже, чем у субпопуляции Th1/Th17 [63]. Существуют также двойные негативные Th17-клетки (CCR6⁺CCR4⁻CXCR3⁻) [51], и в качестве отдельного подтипа Th17-клеток рассматривается субпопуляция, коэкспрессирующая на поверхности CCR4 и CCR10, так называемые Th17/Th22 [68].

На сегодняшний день не ясно, являются ли эти субпопуляции отдельными клоонами клеток или представляют разные стадии дифференцировки единого предшественника, неизвестна также роль этих субпопуляций при РС. Предполагается, что отдельные субпопуляции

Th17 клеток играют разную роль в зависимости от окружающей воспалительной среды, определяемой составом цитокинов, а миграцию в зону воспаления обеспечивает уникальный паттерн экспрессии рецепторов хемокинов [12].

Известно, что разные типы иммунного ответа могут активироваться микроорганизмами, населяющими кишечник. Например, дифференцировке Th17 способствуют некоторые представители кишечной микробиоты, в частности, сегментированные филаментные бактерии (*segmented filamentous bacteria*, SFB) [35, 39, 40]. Причем при стимуляции разными видами микроорганизмов, образовавшиеся Th17-клетки продуцируют различный спектр цитокинов. Так, Th17-клетки, имеющие рецепторы, распознающие *Candida albicans*, могут продуцировать IL-17 и IFN γ , но не IL-10, тогда как Th17-клетки, распознающие *Staphylococcus aureus*, продуцируют IL-17 и могут продуцировать IL-10 при рестимуляции [79].

Образование Th1-клеток стимулируется многими патогенными бактериями [34]. Выявлены также виды бактерий, влияющие на образование регуляторных T-лимфоцитов (Treg), среди которых прежде всего следует отметить *Bacteroides* spp. и *Faecalibacterium prausnitzii* [14, 66]. Неудивительно, что именно в кишечнике сосредоточено наибольшее количество как iTreg, так и Th17 [53].

Учитывая влияние кишечной микробиоты на иммунные функции, в настоящее время активно обсуждается ее роль в патогенезе РС [37, 56]. Этому также способствует ряд исследований, указывающих на вовлечение кишечной микробиоты в развитие ЭАЭ у животных [19, 46]. После колонизации кишечника GF M0G₉₂₋₁₀₆ TCR трансгенных мышей микробиотой от пациентов с РС, у них в большем числе случаев развивался ЭАЭ, чем у мышей, колонизированных микробиотой от здоровых лиц [20]. Развитие ЭАЭ у животных сопровождалось фазовыми изменениями качественного и количественного состава кишечной микробиоты, и микробиоценоз кишечника различался у животных с разной тяжестью ЭАЭ [2].

Использование пероральных препаратов в современной патогенетической терапии сопровождается клинически значимыми побочными эффектами со стороны желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Можно предположить, что в их развитии определенную роль играют изменения состава микробиоты кишечника. В ряде исследований выявлены отличия состава микробиоты кишечника пациентов с РС от здоровых лиц, которые характеризуются как дисбиоз [1, 24, 41, 58], что согласуется с наличием у 70–90% больных РС нарушений функций ЖКТ [1, 47].

Показано, что специфические изменения состава микробиоты у пациентов с ремитирующим течением РС (PP-PC) связаны с селективным увеличением эффекторных Th17 клеток в слизистой оболочке тонкой кишки [26] и специфическими иммунными маркерами на лимфоцитах периферической крови [41, 72]. Однако этих данных пока недостаточно, чтобы сделать определенные выводы об этой связи.

Цель данной работы — оценить уровни отдельных представителей микробиоты кишечника у пациентов с РС и сопоставить их с уровнем циркулирующих в крови субпопуляций Th.

Материалы и методы

Пациенты. В исследовании приняли участие 112 пациентов с диагнозом «рассеянный склероз», 72 женщины (43,3±1,3 лет) и 40 мужчин (39,7±1,8 лет). Характеристика пациентов представлена в таблице 1. Пациенты наблюдались в ФГБУН ИМЧ им. Н.П. Бехтерева РАН и клинике ФГБНУ «ИЭМ» (Санкт-Петербург). Все пациенты подписали информированное согласие и на момент исследования находились в стадии ремиссии.

Контрольную группу в иммунологических исследованиях составили условно-здоровые доноры в количестве 30 человек, соответствующего с пациентами возраста и в той же пропорции по полу.

Исследование состава микробиоты кишечника. Состав просветной микробиоты кишечника пациентов определяли в образцах фекалий в день забора материала. Исследование проводили двумя методами, как было описано ранее: бактериологическим [32] и при помощи полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) [1]. Для проведения ПЦР-РВ из фекалий выделяли ДНК с помощью набора ДНК-ЭКСПРЕСС (Литех, Россия), а затем использовали набор «Колонофлор-16» (ООО «АльфаЛаб», Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Кроме того, у 61 пациента методом ПЦР определяли следующие микроорганизмы: *Roseburia* spp., *Akkermansia muciniphila*, *Sutterella wadsworthensis*, *Prevotella* spp., *Ruminococcus* spp. Для выявления каждого микроорганизма проводили 40 циклов амплификации со специфическими ДНК-праймерами. Последовательности праймеров и условия проведения ПЦР представлены в таблице 2.

Исследование фенотипов иммунных клеток. Фенотипы иммунных клеток определяли методом проточной цитофлуориметрии в венозной крови, полученной путем пункции периферической вены и собранной в вакуумные пробирки с добавлением КЗ ЭДТА. Образцы крови были взяты в тот же день, что и образцы

Таблица 1. Характеристика пациентов

Table 1. Patient characteristics

Показатель Parameter		Пол Sex	Женщины Females	Мужчины Males	Всего Total
Возраст (лет)/Age (years)			43,3±1,3	39,7±1,8	42,0±1,1
Длительность заболевания — ДЗ (лет), M±m Duration of disease — DD (years), M±m			12,5±1,0	10,6±1,2	11,9±0,8
Доля пациентов с разной ДЗ, % Proportion of patients with varying DD, %	< 5 лет/years		20,0	20,0	20,0
	5–10 лет/years		27,1	30,0	28,2
	11–15 лет/years		20,0	17,5	19,1
	> 16 лет/years		32,9	32,5	32,7
EDSS (баллы), M±m/EDSS score, M±m			3,5±0,2	3,4±0,3	3,5±0,1
Доля пациентов с разным EDSS, % Proportion of patients with different EDSS, %	< 3,0 баллов/score		46,5	60,0	51,4
	> 3,5 баллов/score		53,5	40,0	48,6
Скорость прогрессирования РС (EDSS/ДЗ), M±m Rate of MS progression (EDSS/DD), M±m			0,37±0,03	0,48±0,07	0,41±0,03
Доля пациентов с разной скоростью прогрессирования РС, % Proportion of patients with varying rate of MS progression, %	< 0,5 (низкая/low)		78,1	72,2	76,0
	> 0,5 (высокая/high)		21,9	27,8	24,0
Количество (чел.)/Total patients			72	40	112

фекалий и исследовались в день взятия крови. Пробоподготовку и настройку проточного цитофлуориметра проводили в соответствии с рекомендациями, изложенными ранее [8]. Для выявления популяций Th использовали антитела против CD3 (клон UCNT1) и CD4 (клон 13B8.2), для разделения CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов на отдельные субпопуляции — антитела против CD45RA [клон 2H4LDH11LDB9 (2H4)] и CD62L (клон DREG56) с применением тактики «гейтирования», детально описанной ранее [6, 7].

Субпопуляция «наивных» Th обладала фенотипом CD45RA⁺CD62L⁺, клетки с фенотипами CD45RA⁻CD62L⁺ и CD45RA⁻CD62L⁻ соответствовали Th центральной (CM) и эффекторной (EM) памяти соответственно. На всех указанных выше субпопуляциях Th, находившихся

на разных стадиях дифференцировки, при помощи моноклональных антител анализировали уровень экспрессии следующих хемокиновых рецепторов: CCR4 (CD194, клон L291H4), CCR6 (CD196, клон G034E3), CXCR3 (CD183, клон G025H7) и CXCR5 (CD185, клон J252D4). Окраску антителами производили в соответствии с рекомендациями производителей. Удаление эритроцитов из образцов проводили по безотмывочной технологии с использованием лизирующего раствора VersaLyse (Beckman Coulter, США), к 975 мкл которого *ex tempore* добавляли 25 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution (Beckman Coulter, США). После разрушения эритроцитов образцы однократно отмывали большим объемом физиологического раствора при 330g в течение 7 мин, после

Таблица 2. Последовательности праймеров и условия проведения ПЦР

Table 2. Sequence of primers and PCR conditions

Определяемый микроорганизм Microbial species	Последовательности праймеров (5' → 3') Sequence of primers (5' → 3')	t (°C)	Длина фрагмента Length of a fragment (bp)
<i>Roseburia</i> spp.	F: tactgcattggaactgtcg R: cggcaccgaagagcaat	57	230
<i>Prevotella</i> spp.	F: caccaggcgacgatca R: ggataacgcccggacct	58	283
<i>Akkermansia muciniphila</i>	F: cagcacctgaaggtggggac R: ccttgccgttgcttcagat	52	308
<i>Ruminococcus</i> spp.	F: cctctgaccgctcttaatcgagcttcttc R: ccagttatcggtcccaccttcggcagct	60	482
<i>Sutterella wadsworthensis</i>	F: gtgccagcmgccgcgtaa R: gacgtgtgaggccctagcc	57	715

Примечание. F — прямой праймер, R — обратный праймер; последовательность всех праймеров указана с 5'-конца; bp — пары оснований.
Note. F — forward primer, R — reverse primer; the sequence of all the primers is indicated from the 5' end; bp — base pair.

чего надосадов удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в физиологическом растворе с pH 7,2–7,4, содержащем 2% параформальдегида (Sigma-Aldrich, США). Подготовленные пробы анализировали на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США), оснащенном тремя диодными лазерами 405, 488 и 638 нм. Обработку данных проводили при помощи программ Navios Software v.1.2 и Kaluza™ v.1.2 (Beckman Coulter, США).

Статистический анализ. Сравнительный анализ проводили с помощью дисперсионного анализа с апостериорным тестом HSD для неравных N в программе Statistica-8. Для установления статистических взаимосвязей исследуемых параметров использовали корреляции Спирмена. Достоверными при всех статистических анализах считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Определение состава микробиоты кишечника

Бактериологическим методом у всех пациентов в составе кишечной микробиоты определялись симбиотические микроорганизмы — *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. и *Enterococcus* spp., однако их уровень сильно варьировал. Для каждого вида бактерий мы выделили низкий, средний и высокий уровень соответственно, для *Lactobacillus* spp. он составил 6,0 lg/CFU/g, 7,0–8,0 lg/CFU/g, 9,0 lg/CFU/g, для *Bifidobacterium* spp. — 6,0 lg/CFU/g, 8,0–9,0 lg/CFU/g, 10,0 lg/CFU/g и для *Enterococcus* spp. 3,0–5,0 lg/CFU/g, 6,0–7,0 lg/CFU/g, 8,0 lg/CFU/g. Корреляционный анализ показал наличие положительной корреляционной связи между содержанием *Bifidobacterium* spp. с *Lactobacillus* spp. ($r = 0,59$; $p < 0,05$) и *Enterococcus* spp. ($r = 0,4$; $p < 0,05$).

Хотя у 38% пациентов с РС отмечался средний (7,0–8,0 lg/CFU/g) уровень *Escherichia coli* с нормальной ферментативной активностью (N *E. coli*), были пациенты, у которых эти бактерии не выявлялись (30,4%) или определялись на низком (2,0–6,0 lg/КОЕ/г) уровне (32,1%).

Методом ПЦР-РВ у всех пациентов определялись некультивируемые анаэробные виды бактерий *Bacteroides fragilis* и *Faecalibacterium prausnitzii*. Причем у большинства пациентов (73%) их уровень был средним — 9,0–12,0 lg/КОЕ/г и 9,0–10,0 lg/КОЕ/г соответственно. Однако у 1,8% пациентов наблюдался низкий (6,0–7,0 lg/КОЕ/г), и у 25,0% пациентов — высокий (13,0 lg/КОЕ/г) уровень *B. fragilis*. Сниженный ($< 8,0$ lg/КОЕ/г) уровень *F. prausnitzii* отмечался у 5,4% пациентов, а высокий (11,0 lg/КОЕ/г) — у 21,0% пациентов. Кроме того, у 64,0% пациентов выявлялся другой вид бактерий — *Bacteroides thetaiotaomicron* и у 48,0% *Prevotella* spp., также принадлежащие к филу-

му *Bacteroidetes*. *Roseburia* spp. и *Ruminococcus* spp., принадлежащие к филуму *Firmicutes*, были обнаружены у 56,0 и у 34,0% пациентов соответственно, а *Akkermansia muciniphila* (филум *Verrucomicrobia*) — у 43,0%.

Доля пациентов, с разным уровнем симбиотических микроорганизмов представлена на рисунке 1А.

В составе микробиоты кишечника у пациентов определялись также оппортунистические и патогенные виды микроорганизмов, среди которых чаще высевались гамма-протеобактерии: атипичные формы *E. coli* (A *E. coli*) (83,0%), *Enterobacter* spp./*Citrobacter* spp. (76,4%), а также грибы рода *Candida* (30,4%). При этом уровень атипичных форм *E. coli* отрицательно коррелировал с уровнем *E. coli* с нормальной ферментативной активностью ($r = -0,80$; $p < 0,05$) и имел прямую корреляцию с содержанием *Enterobacter* spp./*Citrobacter* spp. ($r = 0,38$; $p < 0,05$).

Бактериологическим методом у пациентов также выявлялись *Staphylococcus aureus* (14,3%), *Klebsiella* spp. (14,3%), *Proteus* spp. (13,4%), *Clostridium* spp. (11,0%), а при помощи ПЦР-РВ — *Sutterella wadsworthensis* (24,6%), *Parvimonas micra* (16,1%) и *Fusobacterium nucleatum* (5,8%) (рис. 1Б). Отмечалась корреляционная связь при выделении *Clostridium* spp. и *Proteus* spp. ($r = 0,49$; $p < 0,05$).

В целом результаты исследования состава микробиоты пациентов с РС в данном исследовании подтверждают наличие дисбиоза кишечника и его гетерогенность, описанные нами ранее на небольшой выборке пациентов [1]. При этом увеличение выборки обследованных пациентов позволило выявить особенности изменения состава микробиоты кишечника у пациентов с РС при различной длительности, тяжести и скорости прогрессирования заболевания.

Так, у пациентов с длительностью заболевания более 16 лет уровень *Enterococcus* spp. был выше, чем у пациентов с меньшей длительностью РС ($F(3;105) = 3,3024$; $p = 0,0232$). В этот период у пациентов также отмечалось возрастание уровня *Bifidobacterium* spp. до 9,2 lg/CFU/g ($F(3;105) = 2,7551$; $p = 0,0463$). При длительности заболевания более 11 лет возрастала вероятность обнаружения у пациентов *Enterobacter* spp. и грибов рода *Candida* ($F(3;105) = 2,7637$; $p = 0,0499$) (рис. 2).

Напротив, *Parvimonas micra* и *Citrobacter* spp. чаще обнаруживались при длительности заболевания до 10 лет, чем при большей длительности $F(3;105) = 4,743$; $p = 0,0043$ и $F(3; 105) = 3,6881$; $p = 0,0143$ соответственно (рис. 2).

С помощью корреляционного анализа подтвердились выявленные закономерности: прямая связь с длительностью заболевания *Enterococcus* spp. ($r = 0,29$; $p < 0,05$), *Bifidobacterium* spp. ($r = 0,23$; $p < 0,05$), *Candida* spp. ($r = 0,22$; $p <$

0,05) и обратная зависимость — с *Parvimonas micra* ($r = -0,30$; $p < 0,05$) и *Citrobacter* spp. ($r = -0,24$; $p < 0,05$).

У пациентов с большей тяжестью заболевания (3,5 и более балла по шкале EDSS) наблюдался более высокий уровень *Enterococcus* spp., *Bifidobacterium* spp. и *Clostridium* spp., тогда как пациенты с тяжестью заболевания до 3 баллов имели более высокий уровень *Prevotella* spp. и *Parvimonas micra* (рис. 3). Корреляционный анализ подтвердил наличие взаимосвязи между этими микроорганизмами и EDSS, причем наиболее сильная связь выявлена с *Bifidobacterium* spp. ($r = 0,43$; $p < 0,05$) и *Enterococcus* spp. ($r = 0,40$; $p < 0,05$). Менее сильная связь с коэффициентами корреляции $r = 0,25$, $r = -0,26$ и $r = -0,24$ наблюдалась для *Clostridium* spp., *Prevotella* spp. и *Parvimonas micra* соответственно ($p < 0,05$).

При высокой скорости прогрессирования заболевания (более 0,5) у пациентов отмечался более низкий уровень *Lactobacillus* spp. и *Roseburia* spp., чем у пациентов с низкой скоростью прогрессирования — 6,8 lg/CFU/g против 7,3 lg/CFU/g ($p = 0,039$) и 2,0 lg/CFU/g против 4,0 lg/

CFU/g ($p = 0,023$) соответственно (рис. 4). Хотя при этом корреляция скорости прогрессирования выявлена только с *Roseburia* spp. ($r = -0,28$; $p < 0,05$).

Таким образом, сравнительный и корреляционный анализ показали наличие связи между уровнями симбиотических микроорганизмов и появлением в составе микробиоты ряда патогенных микроорганизмов с тяжестью, длительностью и прогрессированием РС.

Оценка фенотипов популяций клеток Т-хелперов

Анализ фенотипов иммунных клеток проводили, определяя комбинацию хемокиновых рецепторов у пациентов с РС и в группе здоровых доноров.

Сравнение с контрольной группой показало, что изменения у пациентов с РС связаны с перераспределением субпопуляций Т-хелперов 1 и 17 типа: уменьшением содержания Th1 клеток и увеличением представительства клеток Th17/Th22 и DP Th17 в рамках центральной и эффекторной памяти (рис. 5).

Анализ содержания этих субпопуляций у пациентов с разной длительностью РС вы-

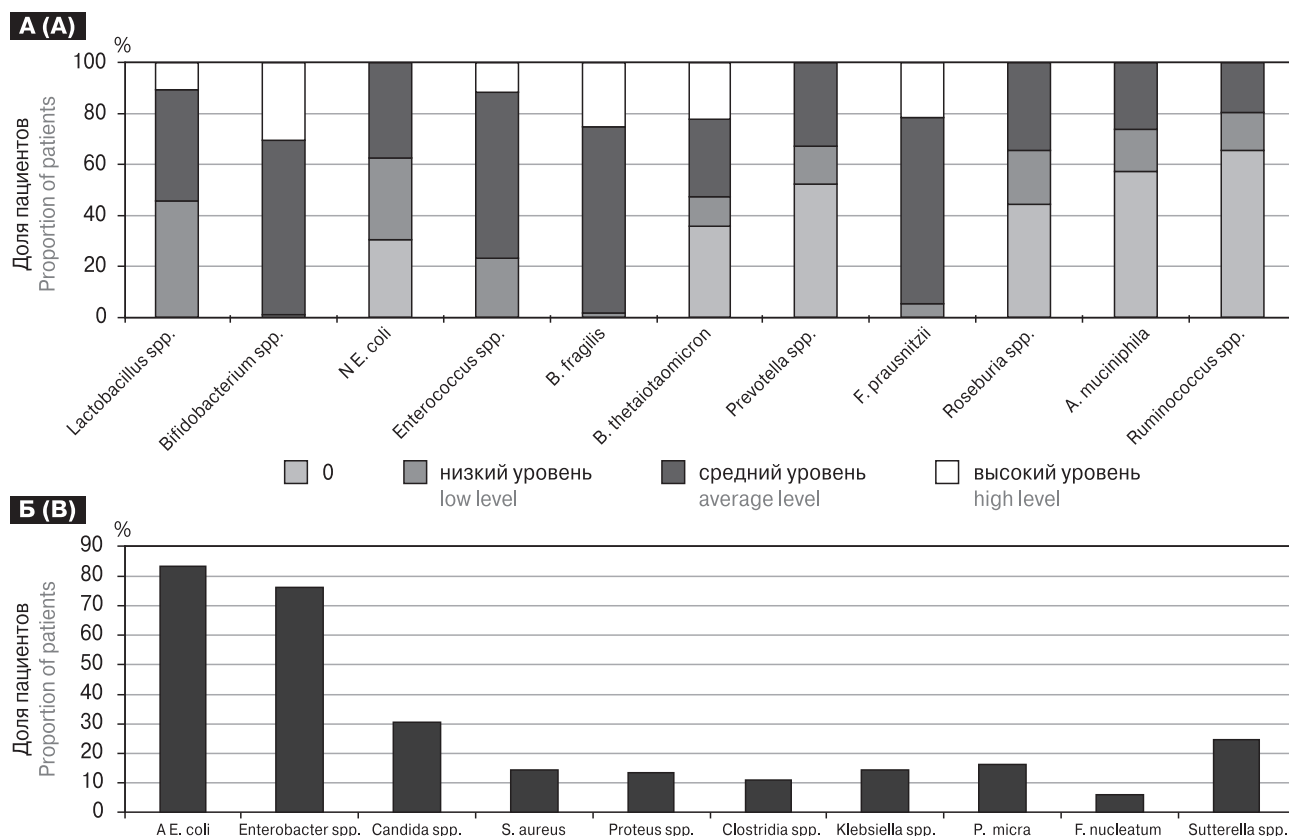


Рисунок 1. Выявляемые микроорганизмы в составе микробиоты кишечника пациентов с РС бактериологическим методом и методом ПЦР в режиме реального времени

Figure 1. Intestinal microbiota composition in MS patients examined by bacteriological method and real-time PCR

Примечание. А — симбиотические виды; Б — оппортунистические виды.

Note. A — symbiotic species; B — opportunistic species.

явил, что субпопуляции Th17/Th22 и DP Th17-клеток в рамках СМ и ЕМ в целом имеют сходную динамику увеличения содержания, с пиком во временном интервале 11–15 лет (рис. 6). Однако корреляционная связь с длительностью заболевания была обнаружена только для DP Th17-клеток СМ ($r = 0,28$; $p < 0,05$) и ЕМ ($r = 0,23$; $p < 0,05$). С другой стороны, содержание Th1 СМ

и ЕМ клеток достоверно не различалось у пациентов с разной длительностью заболевания, но отмечалась отрицательная корреляция ($r = -0,29$; $p < 0,05$).

Доля субпопуляции DP Th17-клеток была также больше у пациентов, имевших более высокий балл по шкале EDSS, как и субпопуляции Th1/Th17 (TEMRA). Напротив, Th2 ЕМ,

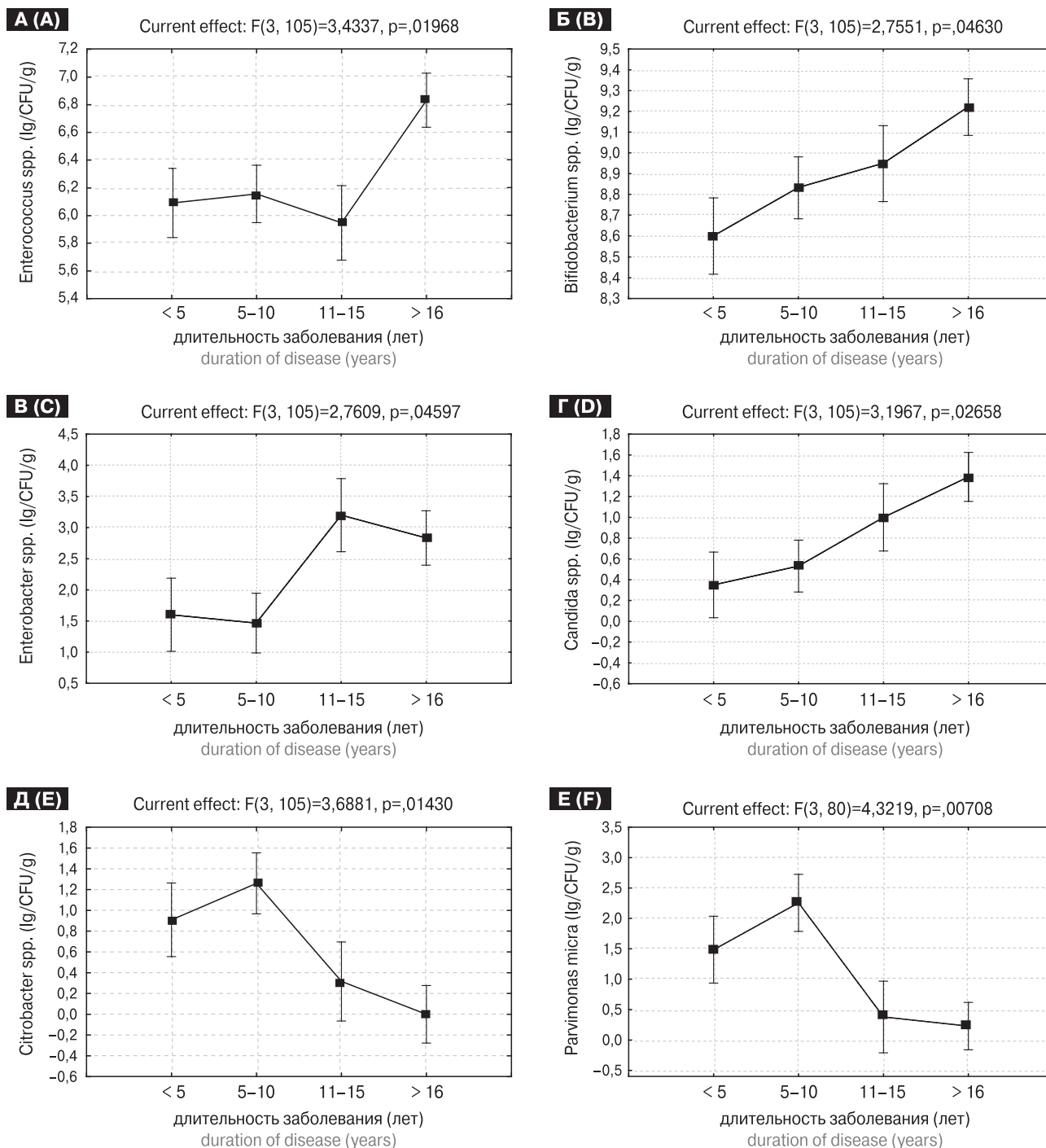


Рисунок 2. Изменения уровней микроорганизмов в составе микробиоты кишечника у пациентов с разной длительностью РС

Figure 2. Changes in percentage of intestinal microbiota species in patients with varying MS duration

Примечание. По оси Y: титр выявляемых микроорганизмов в lg/CFU/g; по оси X: длительность заболевания РС в годах.
Note. Y axis: titer of detectable microorganisms in lg/CFU/g; X axis: duration of MS in years.

Th17 CM и Th17 EM клетки были выявлены в большем количестве у пациентов с низкими баллами по шкале EDSS (рис. 8), при этом содержание Th17 CM клеток у них было сопоставимо с контрольными лицами. Интересно, что низкая представленность Th2 EM и Th17 EM клеток была характерна не только для контрольных лиц, но и для пациентов с тяжелым течением РС (рис. 7). Корреляционный анализ подтвердил наличие связи с EDSS субпопуля-

ции DP Th17 CM ($r = 0,34$; $p < 0,05$) и Th1/Th17 (TEMRA) ($r = 0,31$; $p < 0,05$).

Наконец, пациенты с низкой скоростью прогрессирования заболевания имели более высокое содержание Th1 EM клеток, чем пациенты с быстрым прогрессированием РС, однако этот уровень был ниже, чем у контрольных лиц (рис. 8). Кроме того, у пациентов с высокой скоростью прогрессирования заболевания уровень Th1/Th17 EM клеток был повышен как по срав-

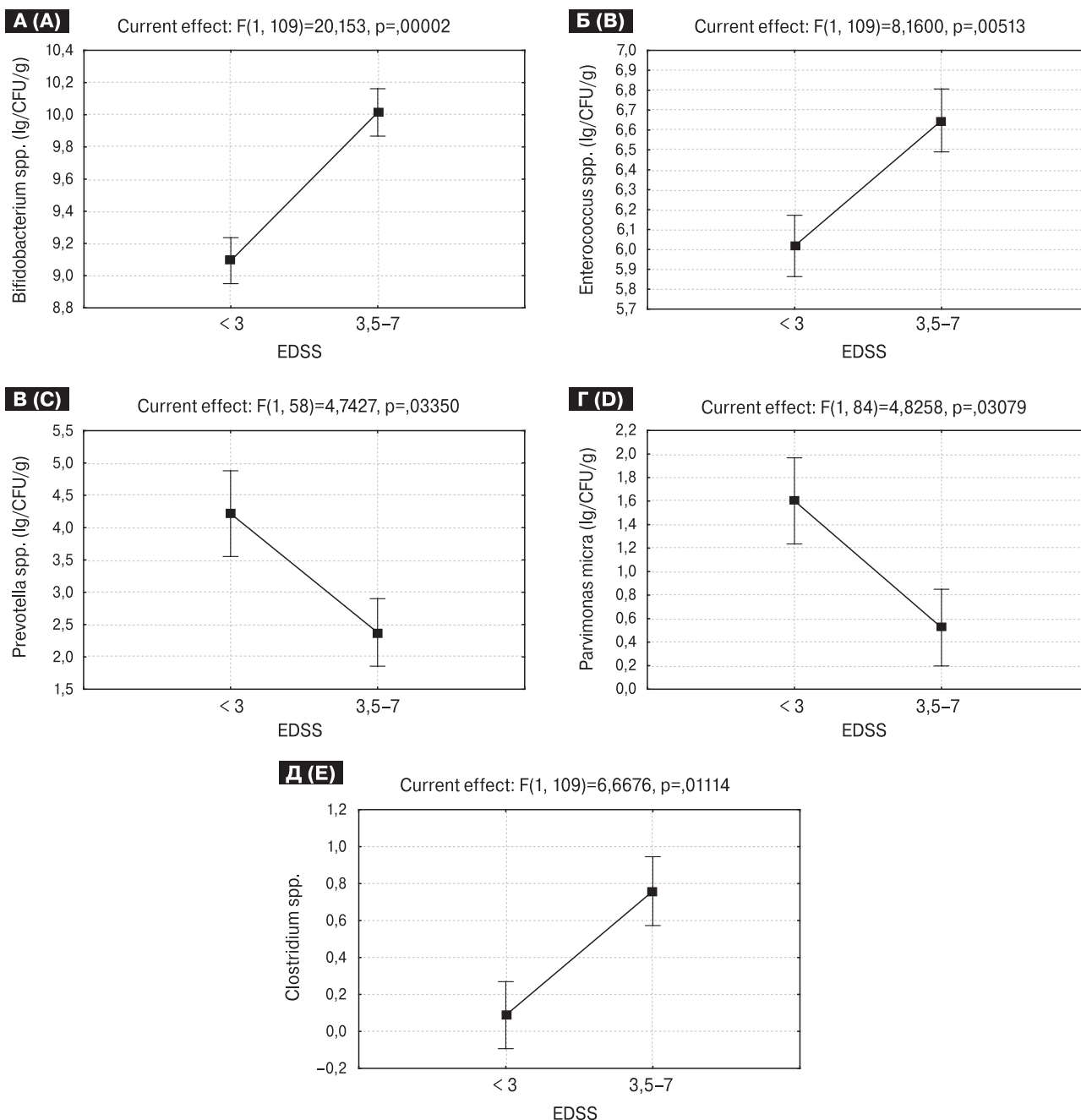


Рисунок 3. Различия уровней микроорганизмов в составе микробиоты кишечника у пациентов с разной тяжестью РС

Figure 3. Changes in percentage of intestinal microbiota species in patients with varying MS severity

Примечание. По оси Y: титр выявляемых микроорганизмов в lg/CFU/g; по оси X: баллы по шкале EDSS.

Note. Y axis: titer of detectable microorganisms in lg/CFU/g; X-axis: EDSS scale, score.

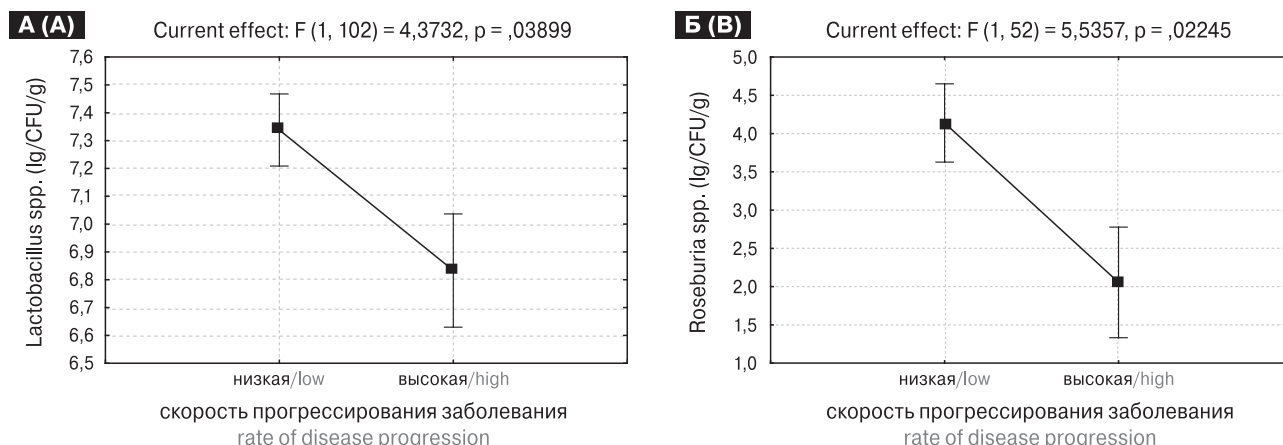


Рисунок 4. Различия в уровнях *Lactobacillus* spp. и *Roseburia* spp. у пациентов с низкой и высокой скоростью прогрессирования РС

Figure 4. Differences in percentage of *Lactobacillus* spp. and *Roseburia* spp. in patients with a low and high rate of MS progression

Примечание. По оси Y: титр выявляемых микроорганизмов в Ig/CFU/g; по оси X: скорость прогрессирования РС.
Note. Y axis: titer of detectable microorganisms in Ig/CFU/g; X axis: rate of MS progression.

нению с контрольными лицами, так и с пациентами, имевшими низкую скорость прогрессирования РС. Коэффициенты корреляции между скоростью прогрессирования и этими субпопуляциями клеток составили $r = -0,33$ и $r = 0,26$, соответственно для Th1 EM и Th1/Th17 EM клеток ($p < 0,05$). Таким образом, наблюдалась связь клинических показателей с содержанием определенных субпопуляций Т-хелперов.

Оценка связи содержания микроорганизмов в составе микробиоты кишечника с циркулирующими субпопуляциями иммунных клеток у пациентов с РС

Для проверки связи между уровнем выявленных микроорганизмов и содержанием субпопуляций иммунных клеток был проведен корреляционный анализ. Данный анализ проводили на когорте пациентов с РС в количестве 69 человек (46 женщин и 23 мужчины), у которых одно-

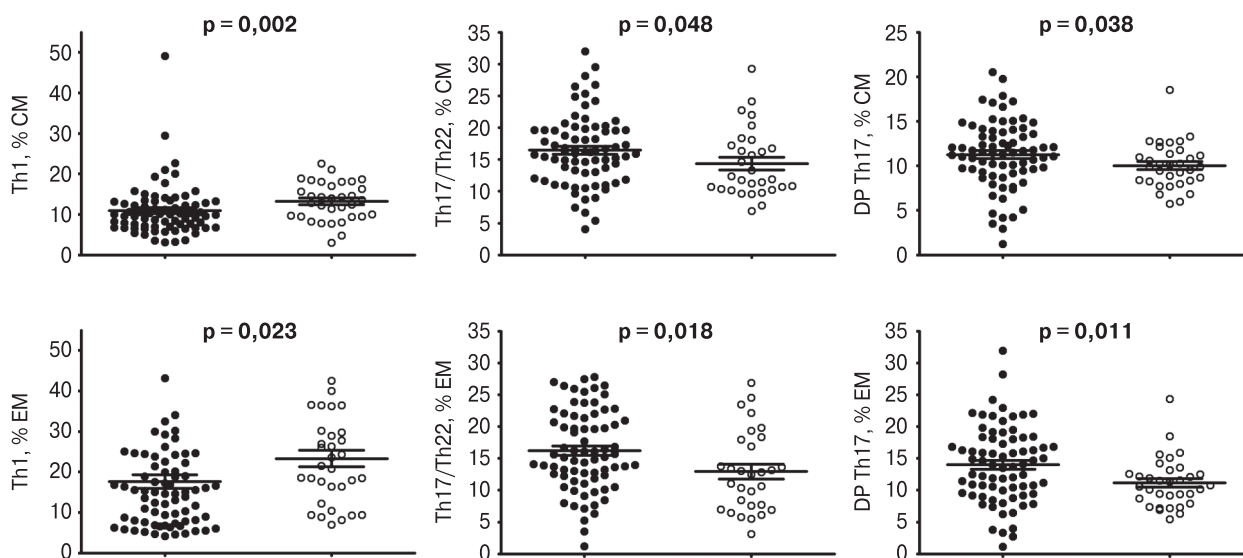


Рисунок 5. Различия в содержании субпопуляций Т-хелперов в крови пациентов с РС и здоровых доноров

Figure 5. Differences in peripheral blood T helper subset composition in MS patients and healthy donors

Примечание. Черные кружки — пациенты с РС; белые кружки — здоровые лица.
Note. Black circles — patients with MS; white circles — healthy controls.

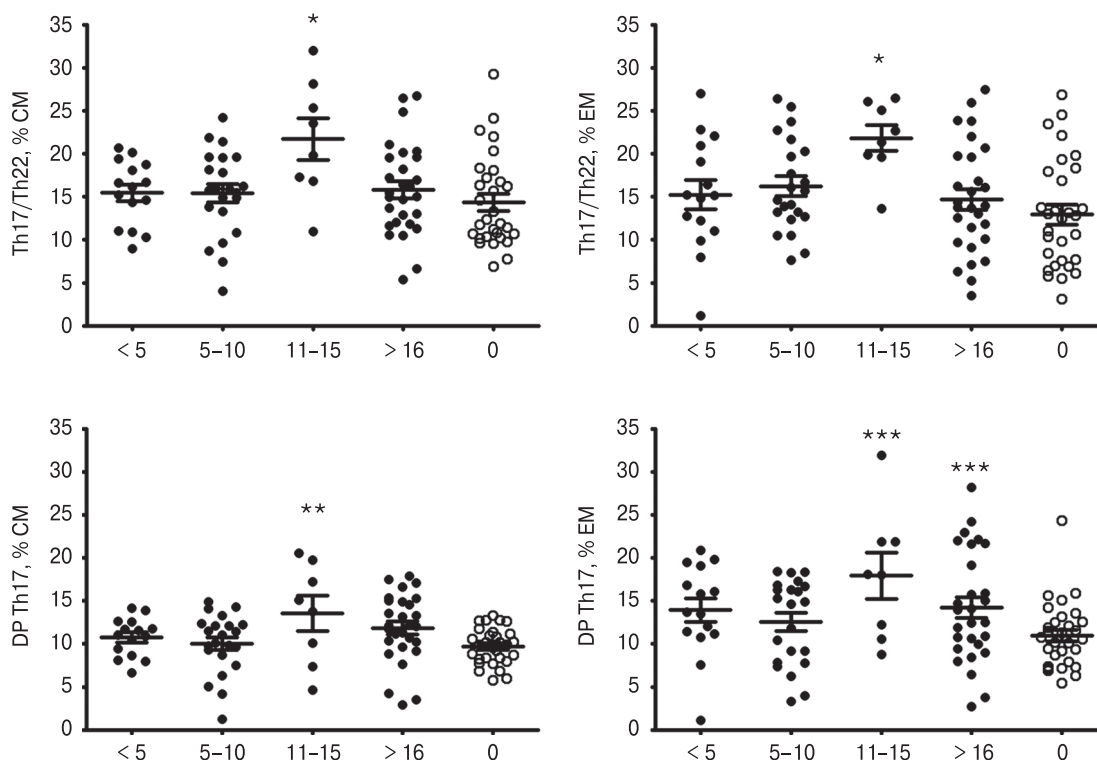


Рисунок 6. Сравнение содержания субпопуляций Th17/Th22 и DP Th17 в рамках CM и EM у пациентов с разной длительностью РС

Figure 6. Percentage of central and effector memory Th17/Th22 and DP Th17 subsets in patients with varying MS duration

Примечание. Черные кружки — пациенты с РС; белые кружки — здоровые лица; по оси Y: исследуемые субпопуляции Th; по оси X: длительность заболевания в годах; 0 — здоровые лица; * — достоверные отличия от других групп; ** — отличия от группы здоровых лиц, группы < 5 лет и группы 5–10 лет; *** — отличия от группы здоровых лиц.

Note. Black circles — MS patients; white circles — healthy controls; Y axis: Th cell subsets; X axis: MS duration in years; 0 — healthy controls; * — significant difference from other groups; ** — compared with healthy controls, a group of 5 years and a group of 5–10 years; *** — compared with healthy controls.

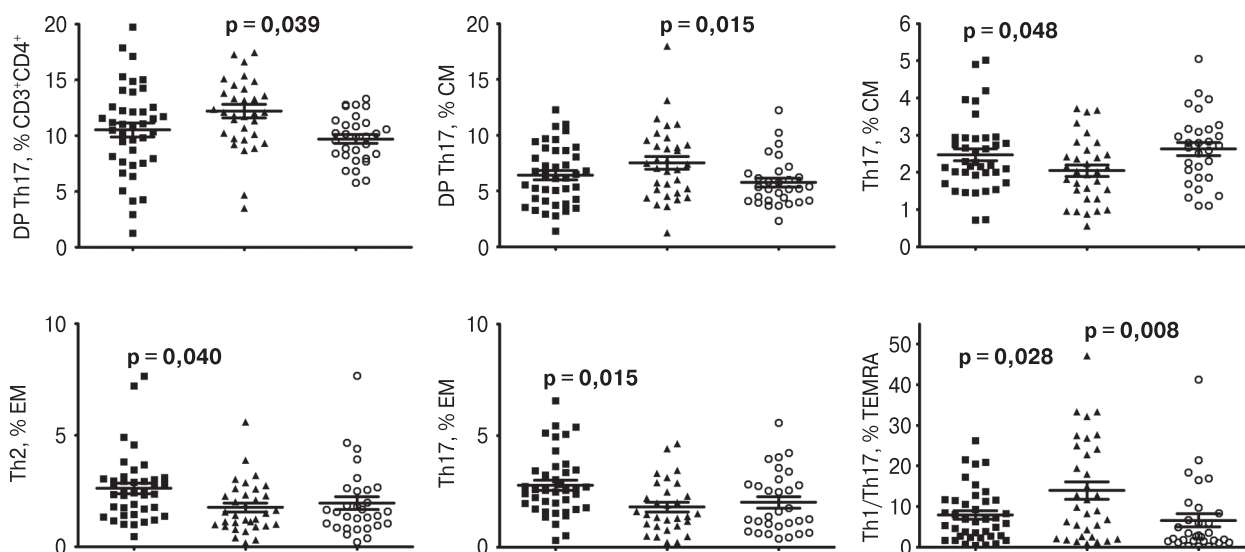


Рисунок 7. Сравнение содержания субпопуляций Т-хелперов у пациентов с различной тяжестью РС

Figure 7. Differences in peripheral blood T helper subset composition in MS patients with varying severity

Примечание. Черные квадраты — EDSS < 3; черные треугольники — EDSS = 3,5–7; белые кружки — здоровые лица.

Note. Black squares — EDSS < 3; black triangles — EDSS = 3,5–7; white circles — healthy faces.

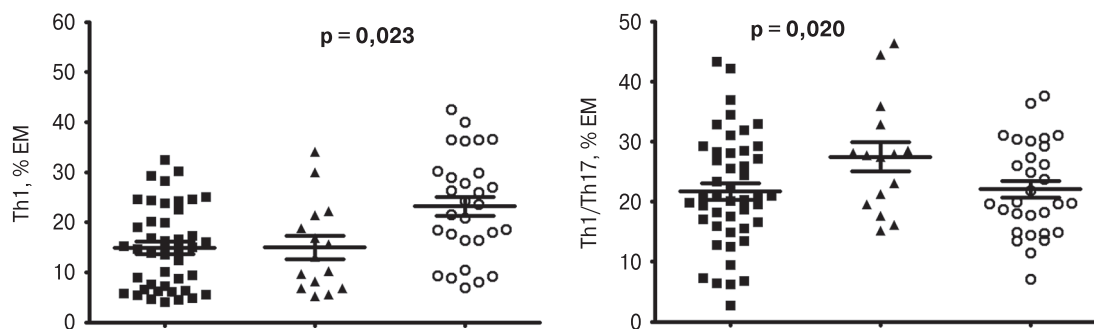


Рисунок 8. Сравнение содержания субпопуляций Т-хелперов у пациентов с высокой и низкой скоростью прогрессирования РС

Figure 8. Differences in peripheral blood T helper subset composition in fast and slow MS progressors

Примечание. Черные квадраты — низкая скорость прогрессирования РС; черные треугольники — высокая скорость прогрессирования РС; белые кружки — здоровые лица.

Note. Black squares — slow PC progression; black triangles — fast PC progression; white circles — healthy controls.

временно исследован состав микробиоты и фенотипы иммунных клеток. Результаты выявленных корреляций представлены в таблице 3.

Из таблицы видно, что уровень Th1 клеток на разных стадиях дифференцировки непосредственно связан с уровнем *Lactobacillus* spp. ($r = 0,32$; $p < 0,05$) и *A. muciniphila*. ($r = 0,36$; $p < 0,05$), поэтому снижение уровня этих микроорганизмов будет приводить к уменьшению содержания Th1 клеток. Напротив, с *Enterococcus* spp., *Prevotella* spp., *Enterobacter* spp. выявлена обратная зависимость, и увеличение титров этих бактерий также будет приводить к уменьшению субпопуляции Th1 клеток. В конечном счете, вероятно, уровень Th1 клеток будет определяться соотношением всех этих микроорганизмов.

Prevotella spp. и *Enterobacter* spp. были также связаны с численностью субпопуляции Th17 с $r = 0,32$ и $r = 0,27$ ($p < 0,05$) соответственно. Других зависимостей уровня микроорганизмов с содержанием этой субпопуляции не выявлено.

Интересно, что содержание общей субпопуляции Th1/Th17 в зависимости от степени дифференцировки в большей степени коррелировало с уровнем *E. coli* с нормальной ферментативной активностью и отрицательно коррелировало с уровнем атипичных *E. coli* и *Enterococcus* spp. (табл. 3).

Уровень *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. и *Enterobacter* spp. коррелировал также с содержанием субпопуляций Th17/Th22 и DP Th17, однако эти зависимости были противоположными тем, что отмечались для Th1. Кроме того, с уровнем Th17/Th22 были связаны *Sutterella* spp. ($r = -0,32$; $p < 0,05$), *Prevotella* spp. ($r = 0,32$; $p < 0,05$), *Klebsiella* spp. ($r = -0,28$; $p < 0,05$). Выявлена также корреляционная связь *Bifidobacterium* spp. с общим содержанием DP Th17 ($r = 0,29$; $p < 0,05$).

Таким образом, наибольшая связь с циркулирующими иммунными клетками выявлена для трех микроорганизмов *Lactobacillus*

spp., *Enterococcus* spp. и *Enterobacter* spp., причем действие *Enterococcus* spp. на субпопуляции Th-клеток было синергично с действием *Enterobacter* spp. и антагонистично с *Lactobacillus* spp.

Обсуждение

В настоящее время можно считать установленными фактами патогенную роль Th17-клеток и влияние микробиоты кишечника на их дифференцировку, а также изменение кишечного микробиоценоза (дисбиоз) при РС. Однако связаны ли между собой изменения микробного профиля в кишечнике с циркулирующими в крови различными субпопуляциями Т-клеток, в том числе Th17 — открытый вопрос, ответ на который важен, как с точки зрения анализа причин возникновения данного заболевания и механизмов его развития, так и для его терапии.

В данной работе предпринята попытка выявить взаимосвязь уровней отдельных видов или родов микроорганизмов в составе микробиоты кишечника с уровнем субпопуляций циркулирующих в крови Th-клеток. Сложность этой задачи определяется как ограниченностью выборки определяемых видов микроорганизмов и индивидуальной изменчивостью состава микробиоценоза кишечника, так и вариабельностью тяжести, скорости прогрессирования, длительности РС и других факторов. Кроме того, в настоящее время неизвестна роль отдельных видов микроорганизмов при РС, что не позволяет делать однозначных выводов. Тем не менее, нам удалось выявить ряд закономерностей, которые имеют, в том числе, и практическое значение.

При анализе полученных результатов принималось во внимание, что кишечная микробиота играет важнейшую роль в формировании и реализации функций головного мозга

и нервной системы за счет многочисленных микробных соединений, нейрометаболитов, кофакторов и сигнальных молекул, влияющих на метаболические, иммунные, гормональные и нервные реакции в желудочно-кишечном тракте и вне его и наличия изменений эпигенетического характера на уровне бактерий и клеток организма [9].

Полученные нами данные о высокой индивидуальной изменчивости состава микробиоты кишечника у пациентов с РС согласуются с данными других авторов, показавших это методами секвенирования микробиома [24, 41, 58]. В работе Miyake S. и соавт. (2015) показано наличие дисбиоза кишечника при РС, который характеризовался изменением относительной численности 21 вида микроорганизмов в составе микробиоты пациентов от здоровых лиц. Известно, что дисбиоз кишечника способствует индукции воспаления в организме человека вследствие эндотоксинемии из-за резкого увеличения поступления в кровь эндотоксинов и мурамилдипептидов грамотрицательных и грамположительных бактерий [61].

Увеличение в составе микробиоценоза кишечника пациентов с РС видов бактерий, принадлежащих роду *Bifidobacterium*, уже было показано ранее [58]. В данном исследовании отмечено, что увеличение количества *Bifidobacterium* spp. происходит у пациентов с большей тяжестью и длительностью заболевания. Интересно, что ранее на модели ЭАЭ более высокий уровень *Bifidobacterium* spp. отмечался на поздних стадиях у крыс, все еще имевших клинические симптомы, по сравнению с выздоровевшими крысами [2]. Выявленная корреляционная связь уровня *Bifidobacterium* spp. с общим содержанием DP Th17-клеток, которые обладают высокой «пластичностью» и способны менять свой фенотип и функциональную активность в зависимости от микроокружения в тканях [75], может свидетельствовать о негативной роли высокого уровня *Bifidobacterium* spp. при РС.

Несколько иная ситуация может быть с *Enterococcus* spp., обладающими более выраженным иммуномодулирующим действием, и с уровнем которых показана связь численного содержания при РС как DP Th17, Th17/Th22, Th1/Th17, так и Th1. Ранее на модели ЭАЭ были показаны существенные различия динамики изменений уровня Т- и В-клеток при введении высоких доз пробиотических энтерококков (8,0 Ig/CFU/g) и иммуномодулятора — глатирамера ацетата (ГА). Это приводило к тому, что при совместном использовании ГА с пробиотическими энтерококками иммуномодулирующая активность последних, по-видимому, подавляла иммуномодулирующие эффекты и нейропротективное действие

Таблица 3. Выявленные корреляции между уровнем микроорганизмов и субпопуляциями Th-клеток (коэффициенты корреляции, r)
 Table 3. A relation between percentage of microbial species and peripheral blood Th cell subsets (correlation coefficient, r)

Микроорганизм Microbial species	Субпопуляции Th/Th subsets																	
	Th1			Th1/Th17			Th17			Th17/Th22			DP Th17		Th2			
	Все All	CM	EM	Все all	CM	EM	Все All	EM	Все All	CM	EM	Все All	CM	EM	Все All	CM	EM	
<i>Lactobacillus</i> spp.		0,32	0,26															
<i>Bifidobacterium</i> spp.																		
<i>Enterococcus</i> spp.		-0,24				-0,24												
<i>N.E. coli</i>			-0,33			0,28												
<i>Prevotella</i> spp.		-0,33							0,34									
<i>Akkermansia muciniphila</i>	0,36																	
<i>A.E. coli</i>																		
<i>Enterobacter</i> spp.	-0,26	-0,38	-0,35			-0,24	-0,26	-0,29										
<i>Klebsiella</i> spp.																		
<i>Sutterella wadsworthensis</i>																		
<i>Clostridium</i> spp.																		-0,28

препарата в целом [3]. Подобный феномен, вероятно, наблюдается и при высоком уровне эндогенных энтерококков у пациентов с РС, которые могут снижать эффективность проводимой терапии. Выявление этих бактерий в высоком титре именно у пациентов с более тяжелым течением заболевания подтверждает эту точку зрения. Поскольку введение только пробиотических энтерококков в высокой дозе, оказывало благоприятное действие на течение ЭАЭ у животных, сопоставимое с действием ГА [3, 10], возможно при высоком уровне эндогенных энтерококков применение иммуномодуляторов не требуется.

Вероятность увеличения патогенных популяций Th17 — DP Th17 и Th17/Th22 — возрастает также при низком уровне *Lactobacillus* spp. Использование пробиотических лактобацилл оказывало позитивный эффект на течение ЭАЭ у животных [76], что также подтверждает необходимость присутствия в кишечнике большого количества бактерий, принадлежащих к роду *Lactobacillus*. Уменьшение содержания *Lactobacillus* spp. отмечали в своем исследовании Chen и соавт. (2016) [24]. Более того, было показано, что уровень CXCR5⁺CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁺ Th в периферической крови больных РС достоверно превышал значения, полученные для условно здоровых доноров, а увеличение этих клеток в циркуляции коррелировало с результатами балльной расширенной шкалы инвалидизации (EDSS) [7].

Интересно, что при наличии в составе микробиоты *Enterobacter* spp. у пациентов отмечались однонаправленные изменения содержания субпопуляций иммунных клеток с энтерококками, а не с другими энтеробактериями — *E. coli*. Ранее нами показано, что заселение *Enterobacter* spp. в кишечнике происходит на фоне уменьшения симбиотических *E. coli* при лечении пациентов с РС пероральными препаратами, особенно финголимодом [4]. Однако высокая частота встречаемости *Enterobacter* spp. у пациентов наряду с отсутствием связи этих бактерий с тяжестью и прогрессированием заболевания, позволяет предположить, что эти кишечные бактерии связаны преимущественно с расстройствами функций ЖКТ, которые встречаются у 70–90% пациентов [1, 47]. Родственные *Enterobacter* spp. бактерии — *Citrobacter* spp. выявлялись реже и в основном у пациентов с длительностью РС до 10 лет.

В исследовании Sekanaviciute E. с соавт. (2017) [23] одним из преимущественных родов в составе микробиоты пациентов с РС был *Acinetobacter*. Мы не определяли эти бактерии методом ПЦР, а при бактериологическом исследовании *Acinetobacter baumannii* были выделены лишь у одного пациента, причем в сочетании

с *E. cloacae* и *C. perfringens*. Интересно, что у пациента отмечался вторично-прогрессирующий РС, 6,5 баллов по шкале EDSS и длительность заболевания — 19 лет. Наличие *C. perfringens* у этого пациента с тяжелым течением РС отражает общую закономерность, наблюдаемую в данной выборке.

Несмотря на то что *Clostridium* spp. выявлялись редко, наблюдалась связь их появления с тяжестью заболевания. Частота выявления *Clostridium* spp. — 11% пациентов, сопоставима с ранее описанной другими авторами, которые обнаружили серопозитивность к *Clostridium* также у 11% пациентов [67]. Известно, что эпсилон-токсин *C. perfringens* способен повреждать нейроны мозжечка и вызывать гибель олигодендроцитов и демиелинизацию [49]. Следует отметить, что в нашей когорте пациентов с РС преимущественно выявлялись именно *C. perfringens*, хотя иногда встречались и *C. difficile*.

В данном исследовании показано наличие отрицательной корреляционной связи между присутствием в составе микробиоты *Clostridium* spp. и увеличением популяции Th2-клеток, однако при оптиконеуромиелите T-клетки пациентов, реагирующие на антигены *C. perfringens*, относились к Th17-клеткам [74].

Нами не обнаружено какой-либо связи уровней *Bacteroides* spp. с тяжестью, скоростью прогрессирования или длительностью РС, как и с исследованными популяциями иммунных клеток. Ранее у пациентов с РС обнаружено снижение некоторых видов *Bacteroides* — *B. stercoris*, *B. coprocola*, и *B. coprophilus* [58]. В данном исследовании оценивался уровень других представителей этого рода — *B. fragilis* и *B. thetaiotaomicron*. Известно, что полисахарид А *B. fragilis* оказывает протективное действие в модели ЭАЭ за счет стимуляции регуляторных T-клеток [62]. Поскольку у пациентов уровень *B. fragilis* различался, можно предположить, что количество регуляторных T-клеток также будет отличаться.

Интересно, что у родственных бактериоидов *Prevotella* spp. наблюдалась связь с тяжестью заболевания и уровнем иммунных клеток. У пациентов с меньшей тяжестью РС был обнаружен более высокий уровень *Prevotella* spp., что согласуется с данными Miyake S. и соавт. (2015) [58], выявившими отрицательную корреляцию *Prevotella copri* с патогенезом РС. Для *Prevotella* spp., как и для *Bacteroides* spp. показана способность стимулировать дифференцировку регуляторных T-клеток [54], тем не менее в нашем исследовании уровень *Prevotella* spp. прямо коррелировал с уровнем Th17/Th22 клеток и обратно коррелировал с уровнем Th1. Интересно, что при ревматоидном артрите показано увеличение численности *Prevotella copri* у заболевших [70].

Показано, что при РС происходит уменьшение бутират-продуцирующих бактерий [58], которые также стимулируют дифференцировку регуляторных Т-клеток [71]. В данном исследовании определялись бутират-продуцирующие *F. prausnitzii* и *Roseburia* spp., но не оценивался уровень регуляторных Т-клеток. Уровень *F. prausnitzii* у большинства пациентов находился в пределах референсных значений, лишь у 5% отмечалось их уменьшение. Для *Roseburia* spp. были выявлены более существенные колебания уровней вплоть до отсутствия у 44%, причем была выявлена отрицательная корреляционная связь между уровнем этих бактерий и скоростью прогрессирования заболевания.

В исследовании Jangi S. и соавт. (2015) у пациентов с РС выявлено увеличение количественного содержания рода *Akkermansia*, принадлежащего к филуму *Verrucomicrobia*. В данном исследовании определялись *A. muciniphila*. Известно, что эти бактерии являются муцин-редуцирующими [28], следовательно, уменьшая слой слизи, могут способствовать нарушению целостности кишечного барьера, транслокации бактерий в несвойственные для их обитания ниши и взаимодействию резидентных иммунных клеток с микробными антигенами [28, 36]. Проникновение микроорганизмов в пространство под базальной мембраной эпителиальных пластов является одним из важнейших факторов, отвечающих за поляризацию «наивных» Th в сторону Th17 [15]. С другой стороны, *A. muciniphila* способны метаболизировать муцин до короткоцепочечных жирных кислот, которые обладают иммунорегуляторными свойствами [29].

Несмотря на то что в целом содержание *Akkermansia* spp. увеличено у пациентов с РС, по сравнению со здоровыми лицами, у пациентов, получавших иммуномодулирующую терапию, их количество уменьшалось [41], что согласуется с данными нашего исследования, так как *A. muciniphila* были обнаружены лишь у 42% пациентов. Наличие и уровень *A. muciniphila* у пациентов с РС коррелировали с содержанием Th1-клеток. Sekanaviciute E. и соавт. (2017) [23] получили сходный эффект *in vitro*, когда к мононуклеарным клеткам крови доноров добавляли экстракты из образцов стула, содержавших *A. muciniphila*, количество Th1, продуцирующих IFN γ , было больше, чем при добавлении экстрактов, не содержащих *A. muciniphila*.

Учитывая тот факт, что количество *Akkermansia* spp. было выше у пациентов с РС, чем у здоровых лиц [41], эти бактерии при РС оказывают скорее негативное влияние, тем более, что показана способность *A. muciniphila* усиливать воспаление во время кишечной инфекции [36]. Поскольку практически у всех пациентов в со-

ставе микробиоты выявлены микроорганизмы, которые могут вызывать кишечные инфекции, это также предполагает их патогенную роль. Тем не менее в эксперименте самцы, имевшие *A. muciniphila*, были резистентны к индукции ЭАЭ в отличие от восприимчивых самок, не имевших этих микроорганизмов [57].

В составе микробиоты исследуемой когорты пациентов редко определялись *S. aureus*, хотя это один из самых распространенных патогенов в человеческой популяции. Возможно, это объясняется тем, что даже в носовых пазухах, являющихся основной нишей обитания этих микроорганизмов, они встречаются менее чем у трети пациентов с РС [60]. Эти авторы обнаружили у пациентов с РС *S. aureus*, имеющие энтеротоксин А, особенно в стадии обострения, и предположили значимость их наличия для обострения РС. Мы не выявили связи наличия этих бактерий с фенотипами исследованных популяций Th-клеток. Возможно, это обусловлено тем, что *S. aureus* в большей степени влияет на клетки врожденного иммунитета, как описывается в обзоре Askarian F. и соавт. (2018) [13].

Повышение уровня *Candida* spp. в составе микробиоты кишечника пациентов по мере увеличения длительности РС, может быть результатом развивающегося дисбиоза в кишечнике. Хотя не было выявлено связи этих микроорганизмов с тяжестью и прогрессированием заболевания, нельзя исключить этого события, поскольку на модели ЭАЭ показано, что *Candida albicans* способствуют более тяжелому течению заболевания у животных [33], а у пациентов с РС показана связь *Candida* с прогрессированием заболевания [69].

Мы не обнаружили достоверных различий в уровне Th17/Th22-клеток в рамках СМ у пациентов с выявленными *Candida* spp., по сравнению с пациентами, не имевшими этих микроорганизмов, тем не менее отмечалась тенденция их более высокого содержания в присутствии *Candida* spp. (17,6% против 15%; $p = 0,11$). Известно, что эти клетки продуцируют IL-22, умеренный уровень которого необходим для защиты кишечного и дыхательного тракта хозяина от грибковых и бактериальных патогенов, однако повышенный уровень этого цитокина, способствует поддержанию воспаления в этих тканях [17].

Ранее при РС была выявлена повышенная частота серопозитивности к нескольким видам грибов рода *Candida* [18] по сравнению со здоровыми лицами, и в спинномозговой жидкости (СМЖ) некоторых пациентов с РС обнаружены белки и ДНК *Candida* spp. [65]. Поскольку мы выявили *Candida* spp. в составе кишечной микробиоты пациентов с РС, можно предпо-

ложить, что в СМЖ они попадают из кишечника вследствие транслокации из-за повышения проницаемости кишечного барьера — феномен, показанный у пациентов с РС Buscarinu M.C. и соавт. (2017) [22].

При анализе фенотипов иммунных клеток были подтверждены ранее полученные данные о том, что у пациентов с РС увеличивается относительное содержание CXCR5⁺CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁺ Т-хелперов, способных к продукции IL-17 и IL-22, в рамках СМ и ЕМ популяций Th [7]. Хотя изначально IL-22 идентифицирован как цитокин, продуцируемый Th1 подмножеством [38] и подмножеством Th22 CD4⁺ Т-клеток человека [30], считается, что этот цитокин — характерный продукт Th17-клеток [48]. Он является ключевым медиатором в координации защиты на барьерных участках, таких как кожа, респираторный и кишечный тракты, из-за способности повышать антибактериальную резистентность эпителиальных клеток [16, 77]. Несмотря на то что количество циркулирующих Th17 ниже, чем Th1, именно эти клетки способны нарушать целостность гематоэнцефалического барьера [42], активно проникают в ЦНС [44] и обнаруживаются в активных очагах РС [50].

Поскольку микробиота кишечника влияет не только на образование Th17, но и запускает процессы, связанные с формированием индукцибельных регуляторных Т-лимфоцитов, способных ограничивать воспалительные реакции как в кишечнике, так и в других отделах организма, включая ЦНС [64], в дальнейшем необходимо проанализировать другие популяции иммунных клеток.

Заключение

В настоящее время исследованию микробиоты кишечника при различных заболеваниях ЦНС уделяется большое внимание, поскольку измененное сообщество микроорганизмов в кишечнике может не только способствовать дисфункции ЖКТ, но и модулировать иммунные функции организма, поддерживая патологический процесс, усугубляя клиническое течение заболевания и влияя на эффективность проводимой терапии.

В данной работе показана значимость не только изменения видового разнообразия кишечной микробиоты, но и количественного содержания отдельных ее представителей для тяжести и прогрессирования заболевания. Обнаружено, что при разном уровне грамположительных и грамотрицательных бактерий, принадлежащих к различным филумам, семействам и видам, отличающимся по антигенным свойствам, рецепторным молекулам и продуцируемым метаболитам в кишечнике, в крови пациентов варьирует количество различных популяций Т-клеток, а также их соотношение и степень дифференцировки. То есть изменение уровня отдельных представителей микроорганизмов, населяющих кишечник, существенно влияет на субпопуляционный состав Th-клеток и спектр секретируемых ими эффекторных молекул.

Результаты проведенного исследования позволяют предположить, что выявление механизмов прямого и опосредованного влияния микробиоты на иммунную систему будет способствовать разработке принципиально новых стратегий терапии РС и других аутоиммунных заболеваний.

Список литературы/References

1. Абдурасулова И.Н., Тарасова Е.А., Ермоленко Е.И., Елисеев А.В., Мацулевич А.В., Бисага Г.Н., Скулябин Д.И., Суворов А.Н., Клименко В.М. При рассеянном склерозе изменяется качественный и количественный состав микробиоты кишечника // Медицинский академический журнал. 2015. Т. 15, № 3. С. 55–67. [Abdurasulova I.N., Tarasova E.A., Ermolenko E.I., Eliseev A.V., Matsulevich A.V., Bisaga G.N., Skulyabin D.I., Suvorov A.N., Klimenko V.M. Multiple sclerosis is associated with altered quantitative and qualitative composition of intestinal microbiota. *Meditinskij akademicheskij zhurnal = Medical Academic Journal*, 2015, vol. 15, no. 3, pp. 55–67. (In Russ.)]
2. Абдурасулова И.Н., Тарасова Е.А., Мацулевич А.В., Елисеев А.В., Ермоленко Е.И., Суворов А.Н., Клименко В.М. Изменение качественного и количественного состава кишечной микробиоты у крыс при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2015. Т. 101, № 11. С. 1235–1249. [Abdurasulova I.N., Tarasova E.A., Matsulevich A.V., Eliseev A.V., Ermolenko E.I., Suvorov A.N., Klimenko V.M. Changes in the qualitative and quantitative composition of the intestinal microflora in rats in experimental allergic encephalomyelitis. *Rossiyskiy fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova = Russian Journal of Physiology (formerly I.M. Sechenov Physiological Journal)*, 2015, vol. 101, no. 11, pp. 1235–1249. (In Russ.)]
3. Абдурасулова И.Н., Ермоленко Е.И., Мацулевич А.В., Абдурасулова К.О., Тарасова Е.А., Кудрявцев И.В., Бисага Г.Н., Суворов А.Н., Клименко В.М. Влияние пробиотических энтерококков и глатирамера ацетат на тяжесть экспериментального аллергического энцефаломиелита у крыс // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2016. Т. 102, № 4. С. 463–479. [Abdurasulova I.N., Ermolenko E.I., Matsulevich A.V., Abdurasulova K.O., Tarasova E.A., Kudryavtsev I.V., Bisaga G.N., Suvorov A.N., Klimenko V.M. Effects of probiotic Enterococci and Glatiramer Acetate on the severity of experimental allergic encephalomyelitis in rats. *Rossiyskiy fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova = Russian Journal of Physiology (formerly I.M. Sechenov Physiological Journal)*, 2016, vol. 102, no. 4, pp. 463–479. doi: 10.1007/s11055-017-0484-1 (In Russ.)]
4. Абдурасулова И.Н., Тарасова Е.А., Никифорова И.Г., Ильвес А.Г., Ивашкова Е.В., Мацулевич А.В., Татаринов А.Е., Шангина Л.В., Ермоленко Е.И., Клименко В.М., Столяров И.Д., Суворов А.Н. Особенности состава микробиоты кишечника у пациентов с рассеянным склерозом, получающих разные ПИТРС // Журнал неврологии и психиатрии

- им. С.С. Корсакова. 2018. Т. 118, № 8, вып. 2. С. 62–69. [Abdurasulova I.N., Tarasova E.A., Nikiforova I.G., Il'ves A.G., Ivashkova E.V., Matsulevich A.V., Tatarinov A.E., Shangina L.V., Ermolenko E.I., Klimenko V.M., Stolyarov I.D., Suvorov A.N. The intestinal microbiota composition in patients with multiple sclerosis receiving different disease-modifying therapies DMT. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova = S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*, 2018, vol. 118, no. 8, iss. 2, pp. 62–69. doi: 10.17116/jnevro201811808262 (In Russ.)]
5. Кудрявцев И.В., Борисова А.Г., Кробинец И.И., Савченко А.А., Серебрякова М.К., Тотолян А.А. Хемокиновые рецепторы на Т-хелперах различного уровня дифференцировки: основные субпопуляции // Медицинская иммунология. 2016. Т. 18, № 3. С. 239–250. [Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Krobinets I.I., Savchenko A.A., Serebriakova M.K., Totolian A.A. Chemokine receptors at distinct differentiation stages of T-helpers from peripheral blood. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, vol. 18, no. 3, pp. 239–250. doi: 10.15789/1563-0625-2016-3-239-250 (In Russ.)]
 6. Кудрявцев И.В., Ильвес А.Г., Борисов А.Г., Минеев К.К., Петров А.М., Савченко А.А., Серебрякова М.К., Столяров И.Д. ССР6-позитивные Т-хелперы периферической крови при рассеянном склерозе // Цитокины и воспаление. 2016. Т. 15, № 2. С. 166–172. [Kudryavtsev I.V., Ilves A.G., Borisov A.G., Mineev K.K., Petrov A.M., Savchenko A.A., Serebriakova M.K., Stolyarov I.D. CCR6-positive T-helper subsets from peripheral blood in multiple sclerosis. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2016, vol. 15, no. 2, pp. 166–172. (In Russ.)]
 7. Кудрявцев И.В., Савицкий В.П. Многоцветный анализ основных субпопуляций Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток методом проточной цитофлуориметрии // Российский иммунологический журнал. 2012. Т. 6 (14), № 3 (1). С. 94–97. [Kudryavtsev I.V., Savitsky V.P. Multicolor flow cytometric analysis of the main subpopulations of T-helpers and cytotoxic T-cells from peripheral blood. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2012, vol. 6 (14), no. 3 (1), pp. 94–99. (In Russ.)]
 8. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян А.А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» (проект) // Медицинская иммунология. 2012. Т. 14, № 3. С. 255–268. [Khaydukov S., Baidun L., Zurochka A., Totolian A. Standardized technology “Research of lymphocytes subpopulation composition in peripheral blood using flow cytometry analyzers” (Draft). *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, vol. 14, no. 3, pp. 255–268. doi: 10.15789/1563-0625-2012-3-255-268 (In Russ.)]
 9. Шендеров Б.А., Голубев В.Л., Данилов А.Б., Прищепа А.В. Кишечная микробиота человека и нейродегенеративные заболевания // Поликлиника. 2016. № 1 (спецвыпуск). С. 7–13. [Shenderov B.A., Golubev V.L., Danilov A.B., Prischepe A.V. Gut human microbiota and neurodegenerative diseases. *Poliklinika = Polyklinika*, 2016, no. 1 (special iss.), pp. 7–13. (In Russ.)]
 10. Abdurasulova I.N., Matsulevich A.V., Tarasova E.A., Kudryavtsev I.V., Serebriakova M.K., Ermolenko E.I., Bisaga G.N., Klimenko V.M., Suvorov A.N. Enterococcus faecium L3 and glatiramer acetate ameliorate of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in rats by affecting different populations of immune cells. *Beneficial Microbes*, 2016, vol. 7, no. 5, pp. 719–729. doi: 10.3920/BM2016.0018
 11. Annunziato F., Cosmi L., Liotta F., Maggi E., Romagnani S. Main features of human T helper 17 cells. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2013, vol. 1284, pp. 66–70. doi: 10.1111/nyas.12075
 12. Aranami T., Yamamura T. Th17 Cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS). *Allergol. Int.*, 2008, vol. 57, no. 2, pp. 115–120. doi: 10.2332/allergolint.R-07-159
 13. Askarian F., Wagner T., Johannessen M., Nizet V. Staphylococcus aureus modulation of innate immune responses through Toll-like (TLRs), (NOD)-like (NLRs) and C-type lectin (CLRs) receptors. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2018. doi: 10.1093/femsre/fuy025
 14. Atarashi K., Nishimura J., Shima T., Umesaki Y., Yamamoto M., Onoue M., Yagita H., Ishii N., Evans R., Honda K., Takeda K. ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. *Nature*, 2008, vol. 455, no. 7214, pp. 808–812. doi: 10.1038/nature07240
 15. Atarashi K., Tanoue T., Shima T., Imaoka A., Kuwahara T., Momose Y., Cheng G., Yamasaki S., Saito T., Ohba Y., Taniguchi T., Takeda K., Hori S., Ivanov I.I., Umesaki Y., Itoh K., Honda K. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science*, 2011, vol. 331, no. 6015, pp. 337–341. doi: 10.1126/science.1198469
 16. Aujla S.J., Chan Y.R., Zheng M., Fei M., Askew D.J., Pociask D.A., Reinhart T.A., McAllister F., Edeal J., Gaus K., Husain S., Kreindler J.L., Dubin P.J., Pilewski J.M., Myerburg M.M., Mason C.A., Iwakura Y., Kolls J.K. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat. Med.*, 2008, vol. 14, no. 3, pp. 275–281. doi: 10.1038/nm1710
 17. Basu R., O'Quinn D.B., Silberger D.J., Schoeb T.R., Fouser L., Ouyang W., Hatton R.D., Weaver C.T. Th22 cells are an important source of IL-22 for host protection against enteropathogenic bacteria. *Immunity*, 2012, vol. 37, no. 6, pp. 1061–1075. doi: 10.1016/j.immuni.2012.08.024
 18. Benito-Leon J., Pisa D., Alonso R., Calleja P., Diaz-Sanchez M., Carrasco L. Association between multiple sclerosis and Candida species: evidence from a case-control study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2010, vol. 29, no. 9, pp. 1139–1145. doi: 10.1007/s10096-010-0979-y
 19. Berer K., Mues M., Koutrolos M., Al Rasbi Z., Boziki M., Johner C., Wekerle H., Krishnamoorthy G. Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature*, 2011, vol. 479, pp. 538–541. doi: 10.1038/nature10554
 20. Berer K., Gerdes L.A., Cekanaviciute E., Jia X., Xiao L., Xia Z., Liu C., Klotz L., Stauffer U., Baranzini S.E., Kumpfel T., Hohlfield R., Krishnamoorthy G., Wekerle H. Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2017, vol. 114, no. 40, pp. 10719–10724. doi: 10.1073/pnas.1711233114
 21. Brucklacher-Waldert V., Stuermer K., Kolster M., Wolthausen J., Tolosa E. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain J. Neurol.*, 2009, vol. 132, iss. 12, pp. 3329–3341. doi: 10.1093/brain/awp289
 22. Buscarinu M.C., Cerasoli B., Annibali V., Policano C., Lionetto L., Capi M., Mechelli R., Romano S., Fornasiero A., Mattei G., Piras E., Angelini D.F., Battistini L., Simmaco M., Umeton R., Salvetti M., Ristori G. Altered intestinal permeability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a pilot study. *Multiple Sclerosis*, 2017, vol. 23, no. 3, pp. 442–446. doi: 10.1177/1352458516652498
 23. Cekanaviciute E., Yoo B.B., Runia T.F., Debelius J.W., Singh S., Nelson C.A., Kanner R., Bencosme Y., Lee Y.K., Hauser S.L., Crabtree-Hartman E., Sand I.K., Gacias M., Zhu Y., Casaccia P., Cree B.A.C., Knight R., Mazmanian S.K., Baranzini S.E. Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2017, vol. 114, no. 42: e 8943. doi: 10.1073/pnas.1716911114

24. Chen J., Chia N., Kalari K.R., Yao J.Z., Novotna M., Soldan M.M., Luckey D.H., Marietta E.V., Jeraldo P.R., Chen X., Weinschenker B.G., Rodriguez M., Kantarci O.H., Nelson H., Murray J.A., Mangalam A.K. Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Sci. Rep.*, 2016, vol. 6: 28484. doi: 10.1038/srep28484
25. Compston A., Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*, 2008, vol. 372, no. 9648, pp. 1502–1517. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61620-7
26. Cosorich I., Dalla-Costa G., Sorini C., Ferrarese R., Messina M.J., Dolpady J., Radice E., Mariani A., Testoni P.A., Canducci F., Comi G., Martinelli V., Falcone M. High frequency of intestinal TH17 cells correlates with microbiota alterations and disease activity in multiple sclerosis. *Sci Adv.*, 2017, vol. 3, no. 7: e1700492. doi: 10.1126/sciadv.1700492
27. Cua D.J., Sherlock J., Chen Y., Murphy C.A., Joyce B., Seymour B., Lucian L., To W., Kwan S., Churakova T., Zurawski S., Wiekowski M., Lira S.A., Gorman D., Kastelein R.A., Sedgwick J.D. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*, 2003, vol. 421, no. 6924, pp. 744–748. doi: 10.1038/nature01355
28. Derrien M., Van Baarlen P., Hooiveld G., Norin E., Müller M., de Vos W.M. Modulation of mucosal immune response, tolerance, and proliferation in mice colonized by the mucin-degrader *Akkermansia muciniphila*. *Front. Microbiol.*, 2011, vol. 2: 166. doi: 10.3389/fmicb.2011.00166
29. Derrien M., Vaughan E.E., Plugge C.M., de Vos W.M. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2004, vol. 54, pt. 5, pp. 1469–1476. doi: 10.1099/ijs.0.02873-0
30. Duhon T., Geiger R., Jarrossay D., Lanzavecchia A., Sallusto F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat. Immunol.*, 2009, vol. 10, no. 8, pp. 857–863. doi: 10.1038/ni.1767
31. Durelli L., Conti L., Clerico M., Boselli D., Contessa G., Ripellino P., Ferrero B., Eid P., Novelli F. T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon-beta. *Ann. Neurol.*, 2009, vol. 65, no. 5, pp. 499–509. doi: 10.1002/ana.21652
32. Ermolenko E., Gromova L., Borschev Yu., Voeikova A., Karaseva A., Ermolenko K., Gruzdkov A., Suvorov A. Influence of different probiotic lactic acid bacteria on microbiota and metabolism of rats with dysbiosis. *Biosci. Microbiota Food Health*, 2013, vol. 32, no. 2, pp. 41–49. doi: 10.12938/bmfh.32.41
33. Fraga-Silva T.F., Mimura L.A., Marchetti C.M., Chiuso-Minicucci F., França T.G., Zorzella-Pezavento S.F., Venturini J., Arruda M.S., Sartori A. Experimental autoimmune encephalomyelitis development is aggravated by *Candida albicans* infection. *J. Immunol. Res.*, 2015, 2015: 635052. doi: 10.1155/2015/635052
34. Fylik H.A., Osborne L.C. The multibiome: the intestinal ecosystem's influence on immune homeostasis, health, and disease. *EbioMedicine*, 2016, vol. 13, pp. 46–54. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.10.007
35. Gaboriau-Routhiau V., Rakotobe S., Lécuyer E., Mulder I., Lan A., Bridonneau C., Rochet V., Pisi A., De Paep M., Brandi G., Eberl G., Snel J., Kelly D., Cerf-Bensussan N. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity*, 2009, vol. 31, no. 4, pp. 677–689. doi: 10.1016/j.immuni.2009.08.020
36. Ganesh B.P., Klopffleisch R., Loh G., Blaut M. Commensal *Akkermansia muciniphila* exacerbates gut inflammation in *Salmonella* Typhimurium-infected gnotobiotic mice. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 9: e74963. doi: 10.1371/journal.pone.0074963
37. Glenn J.D., Mowry E.M. Emerging concepts on the gut microbiome and multiple sclerosis. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2016, vol. 36, no. 6, pp. 347–357. doi: 10.1089/jir.2015.0177
38. Gurney A.L. IL-22, a Th1 cytokine that targets the pancreas and select other peripheral tissues. *Int. Immunopharmacol.*, 2004, vol. 4, no. 5, pp. 669–677. doi: 10.1016/j.intimp.2004.01.016
39. Hill D.A., Artis D. Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.*, 2010, vol. 28, pp. 623–667. doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101330
40. Ivanov I.I., Frutos Rde L., Manel N., Yoshinaga K., Rifkin D.B., Sartor R.B., Finlay B.B., Littman D.R. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe*, 2008, vol. 4, no. 4, pp. 337–349. doi: 10.1016/j.chom.2008.09.009
41. Jangi S., Gandhi R., Cox L.M., Li N., von Glehn F., Yan R., Patel B., Mazzola M.A., Liu S., Glanz B.L., Cook S., Tankou S., Stuart F., Melo K., Nejad P., Smith K., Topçuoğlu B.D., Holden J., Kivisäkk P., Chitnis T., De Jager P.L., Quintana F.J., Gerber G.K., Bry L., Weiner H.L. Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nat. Commun.*, 2016, vol. 7: 12015. doi: 10.1038/ncomms12015
42. Kebir H., Kreymborg K., Ifergan I., Dodelet-Devillers A., Cayrol R., Bernard M., Giuliani F., Arbour N., Becher B., Prat A. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat. Med.*, 2007, vol. 13, no. 10, pp. 1173–1175. doi: 10.1038/nm1651
43. Klemann C., Raveney B.J.E., Klemann A.K., Ozawa T., von Hörsten S., Shudo K., Oki S., Yamamura T. Synthetic retinoid AM80 inhibits Th17 cells and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am. J. Pathol.*, 2009, vol. 174, no. 6, pp. 2234–2245. doi: 10.2353/ajpath.2009.081084
44. Korn T., Bettelli E., Gao W., Awasthi A., Jäger A., Strom T.B., Oukka M., Kuchroo V.K. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature*, 2007, vol. 448, no. 7152, pp. 484–487. doi: 10.1038/nature05970
45. Langrish C.L., Chen Y., Blumenschein W.M., Mattson J., Basham B., Sedgwick J.D., McClanahan T., Kastelein R.A., Cua D.J. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.*, 2005, vol. 201, no. 2, pp. 233–240. doi: 10.1084/jem.20041257
46. Lee Y.K., Menezes J.S., Umesaki Y., Mazmanian S.K. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, vol. 108, suppl. 1, pp. 4615–4622. doi: 10.1073/pnas.1000082107
47. Levinthal D.J., Rahman F., Nusrat S., O'Leary M., Heyman R., Bielefeldt K. Adding to the burden: gastrointestinal symptoms and syndromes in multiple sclerosis. *Mult. Scler. Int.*, 2013, 2013: 319201. doi: 10.1155/2013/319201
48. Liang S.C., Tan X.Y., Luxenberg D.P., Karim R., Dunussi-Joannopoulos K., Collins M., Fouser L.A. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J. Exp. Med.*, 2006, vol. 203, no. 10, pp. 2271–2279. doi: 10.1084/jem.20061308
49. Linden J.R., Ma Y., Zhao B., Harris J.M., Rumah K.R., Schaeren-Wiemers N.S., Vartanian T. *Clostridium perfringens* epsilon toxin causes selective death of mature oligodendrocytes and central nervous system demyelination. *mBio*, 2015, vol. 6, no. 3: e0513–14. doi: 10.1128/mBio.02513-14

50. Lock C., Hermans G., Pedotti R., Brendolan A., Schadt E., Garren H., Langer-Gould A., Strober S., Cannella B., Allard J., Klonowski P., Austin A., Lad N., Kaminski N., Galli S.J., Oksenberg J.R., Raine C.S., Heller R., Steinman L. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat. Med.*, 2002, vol. 8, no. 5, pp. 500–508. doi: 10.1038/nm0502-500
51. Lubberts E. The IL-23-IL-17 axis in inflammatory arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2015, vol. 11, no. 10: 562. doi: 10.1038/nr-rheum.2015.128
52. Martins T.B., Rose J.W., Jaskowski T.D., Wilson A.R., Husebye D., Seraj H.S., Hill H.R. Analysis of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine serum concentrations in patients with multiple sclerosis by using a multiplexed immunoassay. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2011, vol. 136, no. 5, pp. 696–704. doi: 10.1309/AJCP7UBK8IBVMVNR
53. Maynard C.L., Elson C.O., Hatton R.D., Weaver C.T. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*, 2012, vol. 489, no. 7415, pp. 231–241. doi: 10.1038/nature11551
54. Mazmanian S.K., Round J.L., Kasper D.L. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature*, 2008, vol. 453, no. 7195, pp. 620–625. doi: 10.1038/nature07008
55. McFarland H.F., Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat. Immunol.*, 2007, vol. 8, no. 9, pp. 913–919. doi: 10.1038/ni1507
56. Mielcarz D.W., Kasper L.H. The gut microbiome in multiple sclerosis. *Curr. Treat. Options Neurol.*, 2015, vol. 17, no. 4: 344. doi: 10.1007/s11940-015-0344-7
57. Miller P.G., Bonn M.B., Franklin C.L., Ericsson A.C., McKarns S.C. TNFR2 deficiency acts in concert with gut microbiota to precipitate spontaneous sex-biased central nervous system demyelinating autoimmune disease. *J. Immunol.*, 2015, vol. 195, no. 10, pp. 4668–4684. doi: 10.4049/jimmunol.1501664
58. Miyake S., Kim S., Suda W., Oshima K., Nakamura M., Matsuoka T., Chihara N., Tomita A., Sato W., Kim S.W., Morita H., Hattori M., Yamamura T. Dysbiosis in the gut microbiota of patients with multiple sclerosis, with a striking depletion of species belonging to Clostridia XIVa and IV clusters. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 9: e0137429. doi: 10.1371/journal.pone.0137429
59. Montes M., Zhang X., Berthelot L., Laplaud D.A., Brouard S., Jin J., Rogan S., Armao D., Jewells V., Soullillou J.P., Markovic-Plese S. Oligoclonal myelin-reactive T-cell infiltrates derived from multiple sclerosis lesions are enriched in Th17 cells. *Clin. Immunol.*, 2009, vol. 130, no. 2, pp. 133–144. doi: 10.1016/j.clim.2008.08.030
60. Mulvey M.R., Doupe M., Prout M., Leong C., Hizon R., Grossberndt A., Klowak M., Gupta A., Melanson M., Gomori A., Esfahani F., Klassen L., Frost E.E., Namaka M. Staphylococcus aureus harbouring Enterotoxin A as a possible risk factor for multiple sclerosis exacerbations. *Mult. Scler.*, 2011, vol. 17, no. 4, pp. 397–403. doi: 10.1177/1352458510391343
61. Nibali L., Henderson B., Sadiq S.T., Donos N. Genetic dysbiosis: the role of microbial insults in chronic inflammatory diseases. *J. Oral Microbiol.*, 2014, vol. 6: 22962. doi: 10.3402/jom.v6.22962
62. Ochoa-Reparaz J., Mielcarz D.W., Wang Y., Begum-Haque S., Dasgupta S., Kasper D.L., Kasper L.H. A polysaccharide from the human commensal Bacteroides fragilis protects against CNS demyelinating disease. *Mucos. Immunol.*, 2010, vol. 3, no. 5, pp. 487–495. doi: 10.1038/mi.2010.29
63. Paulissen S.M., van Hamburg J.P., Dankers W., Lubberts E. The role and modulation of CCR6+ Th17 cell populations in rheumatoid arthritis. *Cytokine*, 2015, vol. 74, no. 1, pp. 43–53. doi: 10.1016/j.cyto.2015.02.002
64. Pickard J.M., Zeng M.Y., Caruso R., Núñez G. Gut microbiota: role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunol. Rev.*, 2017, vol. 279, no. 1, pp. 70–89. doi: 10.1111/immr.12567
65. Pisa D., Alonso R., Jiménez-Jiménez F.J., Carrasco L. Fungal infection in cerebrospinal fluid from some patients with multiple sclerosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2013, vol. 32, no. 6, pp. 795–801. doi: 10.1007/s10096-012-1810-8
66. Round J.L., Mazmanian S. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, vol. 107, no. 27, pp. 12204–12209. doi: 10.1073/pnas.0909122107
67. Rumah K.R., Linden J., Fischetti V.A., Vartanian T. Isolation of Clostridium perfringens type B in an individual at first clinical presentation of multiple sclerosis provides clues for environmental triggers of the disease. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 10: e76359. doi: 10.1371/journal.pone.0076359
68. Sallusto F., Zielinski C.E., Lanzavecchia A. Human Th17 subsets. *Eur. J. Immunol.*, 2012, vol. 42, no. 9, pp. 2215–2220. doi: 10.1002/eji.201242741
69. Saroukolaei S.A., Ghabaei M., Shokri H., Khosravi A., Badiei A. Evaluation of APR1 gene expression in Candida albicans strains isolated from patients with multiple sclerosis. *Jundishapur. J. Microbiol.*, 2016, vol. 9, no. 5: e33292. doi: 10.5812/jjm.33292
70. Scher J.U., Sczesnak A., Longman R.S., Segata N., Ubeda C., Bielski C., Rostron J.U., Cerundolo V., Pamer E.G., Abramson S.B., Huttenhower C., Littman D.R. Expansion of intestinal Prevotella copri correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *Elife*, 2013, vol. 2: e01202. doi: 10.7554/eLife.01202
71. Sokol H., Pigneur B., Watterlot L., Lakhdari O., Bermúdez-Humarán L.G., Gratadoux J.J., Blugeon S., Bridonneau C., Furet J.P., Corthier G., Grangeon C., Vasquez N., Pochart P., Trugnan G., Thomas G., Blottière H.M., Doré J., Marteau P., Seksik P., Langella P. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, vol. 105, no. 43, pp. 16731–16736. doi: 10.1073/pnas.0804812105
72. Tremlett H., Fadrosch D.W., Faruqi A.A., Hart J., Roalstad S., Graves J., Spencer C.M., Lynch S.V., Zamvil S.S., Waubant E.; US Network of Pediatric MS Centers. Associations between the gut microbiota and host immune markers in pediatric multiple sclerosis and controls. *BMC Neurol.*, 2016, vol. 16, no. 1: 182. doi: 10.1186/s12883-016-0703-3
73. Tzartos J.S., Friese M.A., Craner M.J., Palace J., Newcombe J., Esiri M.M., Fugger L. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am. J. Pathol.*, 2008, vol. 172, no. 1, pp. 146–155. doi: 10.2353/ajpath.2008.070690
74. Varrin-Doyer M., Spencer C.M., Schulze-Toppoff U., Nelson P.A., Stroud R.M., Cree B.A., Zamvil S.S. Aquaporin 4-specific T cells in neuromyelitis optica exhibit a Th17 bias and recognize Clostridium ABC transporter. *Ann. Neurol.*, 2012, vol. 72, no. 1, pp. 53–64. doi: 10.1002/ana.23651
75. Wacleche V.S., Goulet J.P., Gosselin A., Monteiro P., Soudeyns H., Fromentin R., Jenabian M.A., Vartanian S., Deeks S.G., Chomont N., Routy J.P., Ancuta P. New insights into the heterogeneity of Th17 subsets contributing to HIV-1 persistence during antiretroviral therapy. *Retrovirology*, 2016, vol. 13, no. 1, pp. 59. doi: 10.1186/s12977-016-0293-6

76. Yamashita M., Ukibe K., Matsubara Y., Hosoya T., Sakai F., Kon S., Arima Y., Murakami M., Nakagawa H., Miyazaki T. *Lactobacillus helveticus* SBT2171 attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Front. Microbiol.*, 2018, vol. 8: 2596. doi: 10.3389/fmicb.2017.02596
77. Zheng Y., Valdez P.A., Danilenko D.M., Hu Y., Sa S.M., Gong Q., Abbas A.R., Modrusan Z., Ghilardi N., de Sauvage F.J., Ouyang W. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial patho, gens. *Nat. Med.*, 2008, vol. 14, no. 3, pp. 282–289. doi: 10.1038/nm1720
78. Zhu E., Wang X., Zheng B., Wang Q., Hao J., Chen S., Zhao Q., Zhao L., Wu Z., Yin Z. miR-20b suppresses Th17 differentiation and the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis by targeting ROR γ t and STAT3. *J. Immunol.*, 2014, vol. 192, no. 12, pp. 5599–5609. doi: 10.4049/jimmunol.1303488
79. Zielinski C.E., Mele F., Aschenbrenner D., Jarrossay D., Ronchi F., Gattorno M., Monticelli S., Lanzavecchia A., Sallusto F. Pathogen-induced human T(H)17 cells produce IFN- γ or IL-10 and are regulated by IL-1 β . *Nature*, 2012, vol. 484, no. 7395, pp. 514–518. doi: 10.1038/nature10957

Авторы:

Абдурасулова И.Н., к.б.н., ведущий научный сотрудник физиологического отдела им. И.П. Павлова ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; доцент кафедры медицинской биофизики ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия;

Тарасова Е.А., научный сотрудник физиологического отдела им. И.П. Павлова ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 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;

Негореева И.Г., к.м.н., научный сотрудник лаборатории нейробиологии ФГБНУ Институт мозга человека им. Н.П. Бехтерева РАН, Санкт-Петербург, Россия;

Ильвес А.Г., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории нейробиологии ФГБНУ Институт мозга человека им. Н.П. Бехтерева РАН, Санкт-Петербург, Россия;

Серебрякова М.К., научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Ермоленко Е.И., д.м.н., зав. лабораторией биомедицинской микробиологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Ивашкова Е.В., к.м.н., научный сотрудник лаборатории нейробиологии ФГБНУ Институт мозга человека им. Н.П. Бехтерева РАН, Санкт-Петербург, Россия;

Мацулевич А.В., научный сотрудник физиологического отдела им. И.П. Павлова, ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Татаринов А.Е., зав. неврологическим отделением клиники ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Столяров И.Д., д.м.н., профессор, зав. лабораторией нейробиологии ФГБНУ Институт мозга человека им. Н.П. Бехтерева РАН, Санкт-Петербург, Россия;

Клименко В.М., д.м.н., профессор, руководитель физиологического отдела ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Суворов А.Н., член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, зав. кафедрой фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий Факультета стоматологии и медицинских технологий СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия; зав. отделом молекулярной микробиологии, ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Abdurasulova I.N., PhD (Biology), Leading Researcher, Pavlov Department of Physiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; Associate Professor, Department of Medical Biophysics, St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Tarasova E.A., Researcher, Pavlov Department of Physiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, 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;

Negoreeva I.G., PhD (Medicine), Researcher, Laboratory of Neuroimmunology, N.P. Bechtereva Institute of the Human Brain, St. Petersburg, Russian Federation;

Ivles A.G., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Neuroimmunology, N.P. Bechtereva Institute of the Human Brain, St. Petersburg, Russian Federation;

Serebryakova M.K., Researcher, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Ermolenko E.I., PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory of Biomedical Microecology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Ivashkova E.V., PhD (Medicine), Researcher, Laboratory of Neuroimmunology, N.P. Bechtereva Institute of the Human Brain, St. Petersburg, Russian Federation;

Matsulevich A.V., Researcher, Pavlov Department of Physiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Tatarinov A.E., Head of the Neurological Department, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Stoliarov I.D., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Laboratory of Neuroimmunology, N.P. Bechtereva Institute of the Human Brain, St. Petersburg, Russian Federation;

Klimenko V.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Pavlov Department of Physiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Suvorov A.N., RAS Corresponding Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Fundamental Problems of Medicine and Medical Technologies, Faculty of Dentistry and Medical Technologies, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation; Head of the Department of Molecular Microbiology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 11.09.2018
Отправлена на доработку 14.03.2019
Принята к печати 06.06.2019

Received 11.09.2018
Revision received 14.03.2019
Accepted 06.06.2019

НЕИНВАЗИВНЫЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ МАРКЕРЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭРАДИКАЦИИ *HELICOBACTER PYLORI*

Л.Б. Дрыгина, В.Н. Эллиниди, Н.А. Бардышева, М.М. Богословский

ФГБУ Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова МЧС России,
Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Эффективная эрадикация инфекции *Helicobacter pylori* является важным направлением снижения риска развития предраковых изменений слизистой оболочки желудка и профилактики рака желудка. Поиск неинвазивных методов диагностики *Helicobacter pylori*-инфекции, оценки эффективности эрадикации остается актуальным направлением. Цель исследования: оценить информативность определения пепсиногена I и II, антител к *Helicobacter pylori* в сыворотке крови для оценки эффективности лечения хронического хеликобактерного гастрита и выявления пренеопластических изменений слизистой оболочки желудка. В исследование включено 113 пациентов с хроническим гастритом — мужчин в возрасте от 41 до 76 лет, средний возраст — (56,7±0,7) года. Обследование пациентов проводили при поступлении в клинику, через 2 и 12 месяцев после окончания стандартной эрадикационной терапии. *Helicobacter pylori*-инфекция была выявлена у 101 (89,4%) пациента. Выделены группы пациентов с эффективной эрадикацией. В динамике после лечения у пациентов исследовался уровень антител к *Helicobacter pylori*, определялись концентрации пепсиногена I и II. Проводилось сопоставление этих лабораторных показателей с результатами гистологического исследования биоптатов слизистой оболочки желудка и экспрессией онкопротеинов Ki-67, Vcl-2, c-erbB-2, p16 в слизистой оболочке желудка в зависимости от эффективности эрадикационной терапии. Показано, что эффективная эрадикационная терапия характеризуется достоверным снижением уровня антител класса IgG к *Helicobacter pylori* в сыворотке крови уже через 2 месяца лечения. Достоверное снижение пепсиногена II и антител класса IgG к *Helicobacter pylori* в сыворотке крови на фоне эрадикационной терапии сопровождается значимым снижением экспрессии Ki-67 в покровном эпителии. Снижение концентрации пепсиногена II в течение 1 года после эрадикации *Helicobacter pylori* обусловлено в большей степени уменьшением активности воспалительных изменений в слизистой оболочке желудка, чем динамикой ее атрофических и метапластических изменений. Выявлена обратная зависимость уровня пепсиногена I в сыворотке крови от наличия атрофии и кишечной метаплазии в слизистой оболочке желудка.

Ключевые слова: слизистая оболочка желудка, *Helicobacter pylori*, эрадикация, антитела, пепсиноген I, пепсиноген II, онкопротеины Ki-67, Vcl-2, c-erbB-2, p16.

Адрес для переписки:

Дрыгина Лариса Борисовна
194044, Россия, Санкт-Петербург, ул. Акад. Лебедева, 4/2,
ФГБУ Всероссийский центр экстренной и радиационной
медицины имени А.М. Никифорова МЧС России.
Тел.: 8 (812) 702-63-45, доб. 2-304 (служебн.).
E-mail: drygina@arccerm.spb.ru

Contacts:

Larisa B. Drygina
194044, Russian Federation, St. Petersburg, Academica
Lebedeva str., 4/2, Nikiforov Russian Center of Emergency
and Radiation Medicine.
Phone: +7 (812) 702-63-45, add. 2-304 (office).
E-mail: drygina@arccerm.spb.ru

Библиографическое описание:

Дрыгина Л.Б., Эллиниди В.Н., Бардышева Н.А., Богословский М.М. Неинвазивные лабораторные маркеры эффективности эрадикации *Helicobacter pylori* // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 3–4. С. 523–530. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-523-530

Citation:

Drygina L.B., Ellenidi V.N., Bardysheva N.A., Bogoslovskiy M.M. Non-invasive laboratory markers assessing efficacy of *Helicobacter pylori* eradication therapy // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 3–4, pp. 523–530. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-523-530

NON-INVASIVE LABORATORY MARKERS ASSESSING EFFICACY OF *HELICOBACTER PYLORI* ERADICATION THERAPY

Drygina L.B., Ellenidi V.N., Bardysheva N.A., Bogoslovskiy M.M.

The Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine of the Ministry of Russian Federation for Civil Defense, Emergencies and Elimination of Consequences of Natural Disasters, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Effective eradication of *Helicobacter pylori* infection is an important means to reduce the risk of precancerous changes in the gastric mucosa and prevention of gastric cancer. A search for non-invasive diagnostic tools for *Helicobacter pylori* infection, evaluation of the effectiveness of eradication remains of high importance. The aim of the study was to assess an informative value of detecting pepsinogen I and II as well as serum antibodies to *Helicobacter pylori* while assessing an efficacy of treated chronic *Helicobacter* gastritis and identifying preneoplastic changes in the stomach mucosa. There enrolled 113 male patients with chronic gastritis aged 41 to 76, average age- (56.7±0.7) years. Examination of patients was carried out at admission to the clinic, as well as at 2 and 12 months after administering a standard eradication therapy. It was found that *Helicobacter pylori* infection was detected in 101 (89.4%) patients. Groups of patients with effective eradication therapy were noted. A time-dependent level of antibodies to *Helicobacter pylori*, as well as measured concentration of pepsinogen I and II after the onset of eradication treatment were determined. Which were analyzed in connection with the results of histology examination of gastric mucosa biopsy specimens and expression of oncoproteins Ki-67, Bcl-2, c-erbB-2, p16 in the gastric mucosa depending on efficacy of eradication therapy. It is shown that effective eradication therapy was characterized by significantly decreased serum level of IgG antibodies to *Helicobacter pylori* 2 months after the onset of treatment. Moreover, a significantly decreased pepsinogen II and serum IgG antibodies to *Helicobacter pylori* during eradication therapy were accompanied by a significant decrease in Ki-67 expression in the gastric epithelium. Decreased concentration of pepsinogen II within the first year after *Helicobacter pylori* eradication therapy was due to a greater decrease in activity of inflammatory changes in the gastric mucosa than to dynamic changes in gastric atrophy and metaplasia. An inverse relation between the serum level of pepsinogen I and atrophy as well as intestinal metaplasia within the gastric mucosa were found.

Key words: gastric mucosa, *Helicobacter pylori*, eradication, antibodies, pepsinogen I, pepsinogen II, oncoproteins Ki-67, Bcl-2, c-erbB-2, p16.

Введение

Несмотря на успехи в диагностике и лечении, хронический гастрит (ХГ) остается широко распространенным заболеванием. Хронический гастрит в основном ассоциирован с инфекцией *Helicobacter pylori* (Нр), в 85% случаев выявляется при заболеваниях желудка [1, 3, 4, 5]. В настоящее время доказана канцерогенность Нр, показана связь инфекции с развитием атрофических и пренеопластических изменений слизистой оболочки желудка (СОЖ), раком желудка [9]. Маастрихтским консенсусом 2005 г. эрадикация Нр-инфекции признана важным направлением снижения риска развития предраковых изменений СОЖ и профилактики рака желудка [7].

Основными методами диагностики Нр-инфекции считаются морфологический, бактериологический, серологический и уреазные дыхательные тесты. Для ранней диагностики пренеопластических процессов и рака желудка главное значение отводится динамическому эндоскопическому исследованию, дополненному прицельной биопсией с последующим гистологическим исследованием [6]. Однако поиск неинвазивных методов диагностики *Helicobacter pylori*-инфекции, оценки эффективности эрадикации, выявления атрофических и пренеопластических изменений СОЖ остается одним из перспективных направлений гастроэнтерологии и клинико-лабораторной диагностики, что и является целью данной работы.

Материалы и методы

Обследовано 113 пациентов — мужчин в возрасте от 41 до 76 лет, средний возраст — 56,7±0,7 лет с хроническим гастритом, которые проходили лечение в ФГУЗ Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России (начальник отдела — профессор О.А. Саблин).

Клинико-лабораторное обследование пациентов проводили при поступлении в клинику, через 2 и 12 месяцев после окончания стандартной эрадикационной терапии (Megraud F., 2005).

Диагностику Нр-инфекции проводили с помощью прямых методов — полимеразная цепная реакция (ПЦР), гистологического и иммуноцитохимического (ИЦХ) в гастробиоптатах из тела и антрального отдела желудка, и серологическим методом определения антител IgG к Нр в сыворотке крови. Выявление Нр серологическим методом с помощью определения уровня IgG-антител к Нр проводилось всем обследованным пациентам, однако результаты данного теста не были определяющими в диагностике хеликобактериоза, а сравнивались с прямыми методами. При этом Нр был выявлен у 101 (89,4%) пациента.

В первую контрольную группу (Нр-отрицательные) вошли 12 пациентов с функциональной диспепсией и отсутствием Нр-инфекции. Этим пациентам эрадикационная терапия не назначалась.

Разделение пациентов на остальные группы осуществляли через 2 месяца после окончания эрадикационной терапии.

Во вторую группу (эффективная эрадикация) вошли 43 пациента с эндоскопическими признаками ХГ хеликобактерной этиологии, у которых произошла эрадикация *Hp*, что подтвердилось отрицательными результатами ПЦР, ИЦХ и гистологического исследования.

В третью группу (неполная эрадикация) вошли 28 пациентов с эндоскопическими признаками ХГ хеликобактерной этиологии. Через 2 месяца после окончания лечения в этой группе *Hp*-инфекция выявлялась только ПЦР-методом, при отрицательных результатах ИЦХ и гистологического исследования.

Четвертую группу (неэффективная эрадикация) составили 30 пациентов с эндоскопическими признаками ХГ хеликобактерной этиологии, у которых не произошла эрадикация, что проявлялось выявлением *Hp*-инфекции методом ПЦР и любым другим прямым методом, включенным в исследование.

Выделение пациентов с неполной эрадикацией *Hp*-инфекции в отдельную группу было обусловлено следующим: с одной стороны, по результатам ИЦХ и гистологического исследования пациенты могли быть отнесены к группе пациентов с успешной эрадикацией *Hp*. При этом подтверждение результата эрадикации в соответствие с современными стандартами было осуществлено 2 прямыми методами. С другой стороны — бактерия выявлялась методом ПЦР. Необходимо заметить, что если первые два метода позволяют обнаружить, в первую очередь, скопления и реже — единичные бактерии в ткани СОЖ, то метод ПЦР обладает большей чувствительностью и позволяет выявлять единичные бактерии как в вегетативной, так и кокковой форме. Таким образом, выделенную группу больных с неполной эрадикацией мы расценивали как пациентов с минимальным обсеменением СОЖ бактерией *Hp*.

Гистологическое исследование гастробиоптатов проводилось с использованием окраски микропрепаратов гематоксилин-эозином и дополнительных гистохимических окрасок: по Гимзе — для выявления *Hp*, альциановым синим — для выявления кишечной метаплазии.

Иммуноцитохимическое исследование гастробиоптатов для выявления в них *Hp* выполняли с применением поликлональных антител («Vector Lab», США) и авидин-биотиновой системы ферментного усиления (ABC Kit, «Vector Lab», США).

Для исследования *Hp* в биоптатах СОЖ с помощью метода ПЦР использовали тест-систему «АмплиСенс *Helicobacter pylori*» ЦНИИ эпидемиологии МЗ РФ (Москва).

Оценку морфологических изменений СОЖ через 1 год после лечения проводили у 74 из 113 обследованных пациентов. Из исследования были исключены 39 пациентов, у которых по какой-либо причине не удалось получить гастробиоптаты и провести их гистологическое исследование в динамике.

Для определения Ki-67 — маркера пролиферативной активности, Bcl-2 — антиапоптотического белка, онкопротеинов p16 и c-erbB-2 в СОЖ использовали иммуногистохимический метод с применением высокочувствительного метода En Vision со специфическими мышечными моноклональными антителами к Ki-67 (RTU; Dako Cytomation, Дания), к Bcl-2 (разведение 1:1, Dako Cytomation, Дания), к p16 (разведение 1:50, Dako Cytomation, Дания) и онкопротеину c-erbB-2 (разведение 1:500, Dako Cytomation, Дания).

Количественное определение пепсиногена I (ПГ I), пепсиногена II (ПГ II) и антител класса IgG к *Hp* в сыворотке крови человека проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью тест-систем фирмы «BIONIT», (Финляндия). Оптическую плотность образцов измеряли на многоканальном спектрофотометре ELx 800 «Bio-Tek» (США) при длине волны 450 нм.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакета прикладных программ «Statistica 6.0» с определением средних значений, стандартной ошибки среднего, стандартного отклонения, максимальных и минимальных значений. Достоверность различия средних показателей оценивали с помощью *t*-критерия по Стьюденту и критерия сравнения Вилкоксона. Для многомерного статистического анализа использовали корреляционный (методы Спирмена, гамма) и дисперсионный (метод Краскела—Уоллеса) виды анализа.

Результаты и обсуждение

В группе пациентов с неэффективной эрадикацией уровень IgG-антител к *Hp* был высоким на всех этапах и достоверно отличался от других обследованных *Hp*-положительных групп (рис. 1). Через 2 месяца у пациентов этой группы отмечалась тенденция к нарастанию уровня антител, который в 2 раза превышал значения в группах пациентов с эффективной и неполной эрадикацией.

Через 1 год в группе пациентов с неэффективной эрадикацией было зарегистрировано незначительное снижение, до 90 относительных единиц (EIU), но уровень антител по-прежнему достоверно отличался от значений в группах пациентов с эффективной и неполной эрадикацией.

В группе пациентов с эффективной эрадикацией уже через 2 месяца выявили снижение в 1,3 раза уровня антител, а в группе Нр-положительных с неполной эрадикацией — в 1,1 раза, хотя уровень антител в этих подгруппах оставался достоверно более высоким по отношению к НР0 ($p < 0,05$). Через 12 месяцев в группе с эффективной эрадикацией уровень антител снизился в 1,7 раза, в группе с неполной эрадикацией — в 2,4 раза от первоначального и был близок к референтному значению 42 ЕІU и значениям уровня антител в контрольной группе НР0.

Таким образом, определение уровня антител класса IgG к Нр в сыворотке крови при проведении эрадикационной терапии имеет важное значение для оценки ее эффективности. Снижение уровня антител класса IgG к Нр в сыворотке крови через 2 месяца после проведения эрадикационной терапии у пациентов с ХГ можно рассматривать в качестве критерия ее эффективности. Прямые методы диагностики: ПЦР, гистологический и иммуноцитохимический анализ целесообразно проводить в более поздний период — через 12 месяцев после лечения.

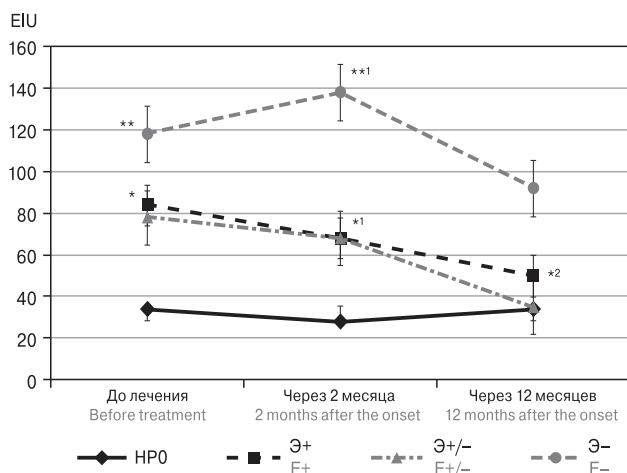


Рисунок 1. Уровень IgG антител к *Helicobacter pylori* в сыворотке крови в группах пациентов до и после лечения

Figure 1. Serum level of *Helicobacter pylori*-specific IgG antibodies before and after eradication treatment

Примечания. Нр0 — Нр-отрицательные; Э+ — эффективная эрадикация; Э+/- — неполная эрадикация; Э- — неэффективная эрадикация. *, * $p < 0,05$ между группой Нр0 и группами Э+, Э+/-; **, *** $p < 0,001$ между группой Нр0 и группой Э-; * $^2p < 0,05$ между группой Э- и группами Нр0, Э+, Э+/-.
Notes. Нр0 — Нр-negative; E+ — efficient eradication; E+/- — incomplete eradication; E- — inefficient eradication. *, * $p < 0.05$ by comparing group Нр0 vs. groups E+, E+/-; **, *** $p < 0.001$ by comparing group Нр0 vs. group E-; * $^2p < 0.05$ by comparing group E- vs. group Нр0, E+, E+/- groups.

Изменения ПГ II в сыворотке крови в обследуемых группах пациентов в динамике представлены на рисунке 2. Исходно у Нр-отрицательных пациентов концентрация ПГ II была значительно ниже ($p < 0,05$), чем у Нр-положительных. Уровень ПГ II в группах Нр-положительных пациентов более чем в 2 раза превышал референтные значения 3–10 мкг/л.

Через 2 месяца после лечения в группах пациентов с эффективной и неполной эрадикацией отмечалось значимое ($p < 0,05$) снижение ПГ II до верхней границы референтного диапазона (менее 10 мкг/л). Понижение уровня ПГ II также отмечалось в группе с неэффективной эрадикацией и составляло $16,3 \pm 2,2$ мкг/л.

Через 12 месяцев в группах пациентов с эффективной и неполной эрадикацией концентрация ПГ II не превышала 15 мкг/л. В группе пациентов с неэффективной эрадикацией концентрация ПГ II составляла $26,8 \pm 0,56$ мкг/л и была достоверно ($p < 0,05$) выше, чем в остальных группах.

При оценке динамики уровня ПГ II был охарактеризован еще один критерий, позволяющий в определенной степени прогнозировать исход эрадикационной терапии у больных

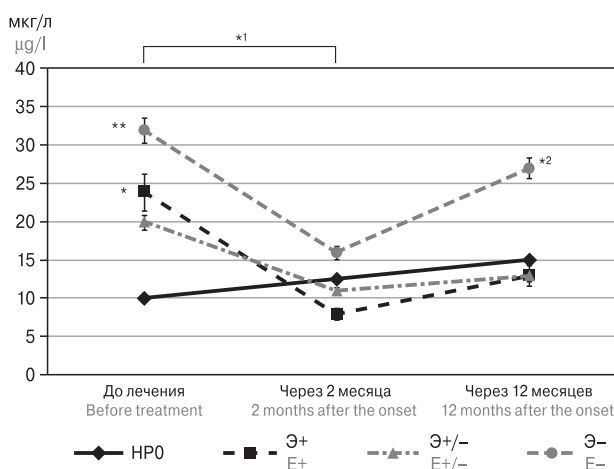


Рисунок 2. Уровень пепсиногена II в сыворотке крови у пациентов до и после лечения

Figure 2. Serum pepsinogen II level in patients before and after treatment

Примечания. Нр0 — Нр-отрицательные; Э+ — эффективная эрадикация; Э+/- — неполная эрадикация; Э- — неэффективная эрадикация. * $p < 0,05$ между группой Нр0 и группами Э+, Э+/-; * $^1p < 0,05$ в группах Э+, Э+/-, Э- до и через 2 мес. после лечения; * $^2p < 0,05$ между группой Э- и группами Нр0, Э+, Э+/-; ** $p < 0,001$ между группой Нр0 и группой Э-.
Notes. Нр0 — Нр-negative; E+ — efficient eradication; E+/- — incomplete eradication; E- — inefficient eradication. * $p < 0.05$ by comparing group Нр0 vs. groups E+, E+/-; * $^1p < 0.05$ by comparing group E+ vs. E+/- vs. E- before and 2 months after treatment; * $^2p < 0.05$ by comparing group E- vs. groups Нр0, E+, E+/-; ** $p < 0.001$ by comparing group Нр0 vs. group E-.

с хроническим Нр-ассоциированным гастритом. Высокая концентрация ПГ II в сыворотке крови через 2 месяца после лечения является критерием неэффективной эрадикационной терапии, в то время как снижение ПГ II менее 15 мкг/л — предиктором успешной эрадикационной терапии.

На следующем этапе исследования было проведено сопоставление выявленных нами критериев эффективности эрадикационной терапии (уровень антител к Нр-инфекции и ПГ II) с рядом морфологических показателей СОЖ.

Было установлено, что до лечения у большинства пациентов преобладала выраженная степень инфильтрации мононуклеарами СОЖ в антральном отделе и в теле желудка. Через 1 год в группах пациентов с успешной и неполной эрадикацией Нр выраженность инфильтрации как в антральном отделе, так и в теле желудка снижалась. На фоне неудачной эрадикации данных изменений не происходило. Показано, что сохранение инфильтрации мононуклеарами коррелировало с неэффективностью лечения.

Инфильтрация нейтрофилами антрального отдела желудка встречалась у 68 (91,8%) больных до лечения, а после лечения — только у 35 (47,0%). Наиболее значимое ($p < 0,05$) снижение инфильтрации нейтрофилами слизистой оболочки в антральном отделе и теле желудка выявлено у пациентов с успешной эрадикацией: до лечения выраженная степень нейтрофильной инфильтрации СОЖ выявлялась в 7 случаях (22,6%), а через 2 мес. и через 1 год — не выявлялась.

До лечения была установлена положительная корреляция между степенью инфильтрации нейтрофилами слизистой оболочки антрального отдела желудка и уровнем ПГ II ($r = 0,37$; $p < 0,05$), а также степенью инфильтрации мононуклеарами слизистой оболочки антрального отдела желудка и уровнем ПГ II ($r = 0,25$; $p < 0,05$).

Определялась положительная корреляция между степенью инфильтрации нейтрофилами в слизистой оболочке тела желудка и уровнем ПГ II ($r = 0,35$; $p < 0,05$), и между степенью инфильтрации мононуклеарами с уровнем ПГ II ($r = 0,41$; $p < 0,05$) до лечения.

Таким образом, полученные результаты показывают, что уровень ПГ II является клинико-лабораторным критерием активности воспалительного процесса в СОЖ.

По результатам гистологического исследования выявили, что до лечения атрофические изменения локализовались преимущественно в антральном отделе желудка (у 31,1% пациентов), чаще встречалась атрофия умеренной степени. Значительно реже эти изменения выявлялись в теле желудка — у 9 (12,1%) человек. Через

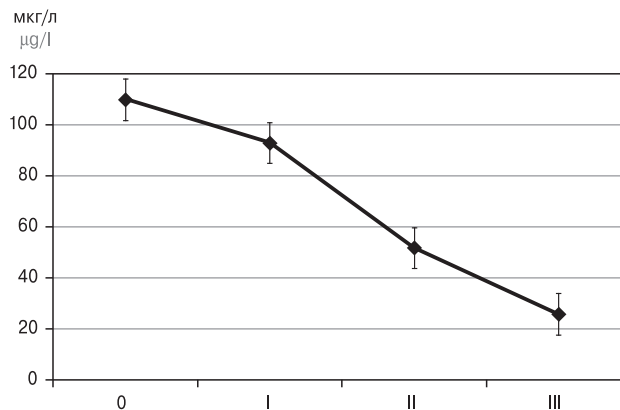


Рисунок 3. Зависимость средних значений пепсиногена I от степени атрофии (0–III) в теле желудка до лечения

Figure 3. A relation between average pepsinogen I level and degree of stomach body atrophy (0–III) before treatment

1 год после проведения эрадикационной терапии не было установлено значимых изменений распространенности и выраженности атрофии СОЖ.

До начала лечения была установлена отрицательная корреляция между наличием атрофии в теле желудка и уровнем ПГ I ($r = -0,49$; $p < 0,05$). Наиболее низкие значения ПГ I наблюдались у пациентов с выраженной степенью атрофии (рис. 3).

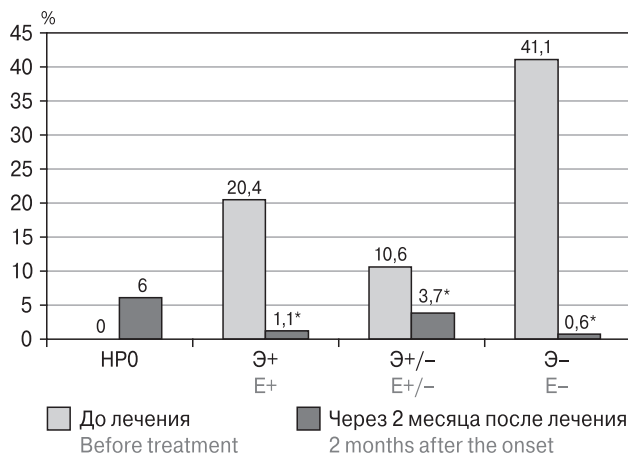


Рисунок 4. Экспрессия Ki-67 в эпителиоцитах СОЖ, среднее значение (%)

Figure 4. Expression of Ki-67 marker in gastric mucosa epithelial cells, mean values (%)

Примечания. Нр0 — Нр-отрицательные; Э+ — эффективная эрадикация; Э+/- — неполная эрадикация; Э- — неэффективная эрадикация. * $p < 0,05$ в группах пациентов до и через 2 месяца после лечения.
Notes. Нр0 — Нр-negative; E+ — efficient eradication; E+/- — incomplete eradication; E- — inefficient eradication. * $p < 0.05$ by comparing groups before and 2 months after treatment.

Таблица. Корреляция между показателями функциональной активности СОЖ, уровнем антител к Hp и Ki-67 до лечения

Table. Correlation between indices of functional activity of the coolant, the level of antibodies to Hp and Ki-67 before treatment

Показатели Parameters	ПГ I PGI	ПГ II PGII	IgG к Hp
Ki-67 (покровный эпителий/surface epithelium)	0,01	0,3*	0,41*
Ki-67 (желудочные ямки/gastric pits)	0,03	0,21*	0,02
Ki-67 (донные отделы желез/fundic region of glands)	0,05	0,42*	0,53*

Примечание. * Значимые корреляции ($p < 0,05$).Note. * Significant correlations ($p < 0.05$).

У 46 (40,7%) пациентов на фоне атрофических изменений слизистой оболочки антрального отдела и в теле желудка выявлялась кишечная метаплазия. Наиболее распространенным типом кишечной метаплазии была тонкокишечная метаплазия. До лечения метапластические изменения СОЖ выявлены у 21 (18,5%) пациента в антральном отделе, у 9 (7,96%) пациентов — в теле желудка и у 16 (14,1%) — в антральном отделе и теле желудка. Через 1 год после эрадикационной терапии частота обнаружения кишечной метаплазии имела тенденцию к снижению. В антральном отделе желудка кишечная метаплазия выявлялась у 18 (15,9%) пациентов, у 7 (6,2%) — в теле желудка, а у 10 (8,8%) — в обоих отделах.

При анализе результатов гистологического исследования необходимо учитывать не только наличие метаплазии, но и ее тип, так как неполная метаплазия (толстокишечный тип) относится к предраковым изменениям СОЖ [2, 8]. Толстокишечная метаплазия в антральном отделе была выявлена у 3 (4,1%) пациентов до лечения и у 2 (2,7%) — после лечения. В теле желудка толстокишечная метаплазия была выявлена только у 1 (1,38%) пациента.

При сравнительном анализе до начала лечения была установлена отрицательная корреляция между кишечной метаплазией в теле желудка и уровнем ПГ I ($r = -0,35$; $p < 0,05$). Через 2 месяца после лечения отрицательная связь с концентрацией ПГ I в сыворотке крови ($r = -0,39$; $p < 0,05$) сохранялась.

Подтверждением отрицательной корреляции между снижением ПГ I и неопластическими состояниями явилось наблюдение за 2 пациентами, у одного из них была выявлена дисплазия эпителия низкой степени в антральном отделе желудка, у другого — рак желудка. При этом важно отметить, что у больного раком желудка определялось выраженное снижение сывороточной концентрации ПГ I, которое составляло до лечения 5,3 пмоль/л, а через 2 и 12 месяцев после лечения — 4,4 и 7,3 пмоль/л соответственно.

Таким образом, низкий уровень концентрации ПГ I в сыворотке крови сочетается с повышенным риском развития пре- и неопластических изменений слизистой оболочки желудка.

Нами проведена оценка экспрессии онкопротеинов Ki-67, Vcl-2, c-erbB-2, p16 в слизистой оболочке желудка в зависимости от эффективности эрадикационной терапии.

Экспрессия Vcl-2 в эпителиоцитах СОЖ не обнаружена. В исследовании во всех случаях наблюдалась экспрессия Vcl-2 в лимфоцитах мантийной зоны лимфоидного фолликула: до лечения степень экспрессии Vcl-2 у всех пациентов составляла 74,9%, через 2 месяца после лечения значимая динамика не определялась, степень экспрессии была 88,2%.

До лечения выраженность экспрессии Vcl-2 положительно коррелировала с нейтрофильной инфильтрацией в антральном отделе ($r = 0,4$; $p < 0,05$) и в теле желудка ($r = 0,31$; $p < 0,05$). Также была выявлена положительная взаимосвязь между экспрессией Vcl-2 и инфильтрацией мононуклеарами в антральном отделе ($r = 0,55$; $p < 0,05$) и в теле желудка ($r = 0,34$; $p < 0,05$).

Экспрессия p16 была обнаружена у 20 пациентов с кишечной метаплазией (24,3%), с дисплазией ($n = 1$) и при раке желудка ($n = 1$). Значимых корреляций между экспрессией онкобелка p16 и сывороточными маркерами функциональной активности СОЖ не установлено.

Слабая экспрессия c-erbB-2 встречалась у 25 (33,7%) пациентов. Выявлена положительная корреляция c-erbB-2 с нейтрофильной инфильтрацией в антральном отделе ($r = 0,52$; $p < 0,05$) и в теле желудка ($r = 0,33$; $p < 0,05$). В то же время была выявлена положительная связь между уровнем экспрессии c-erbB-2 и степенью инфильтрации моноцитами в антральном отделе ($r = 0,79$; $p < 0,05$) и в теле желудка ($r = 0,55$; $p < 0,05$). Значимых корреляций между тканевой экспрессией онкобелка c-erbB-2 и клинико-лабораторными показателями функциональной активности СОЖ в сыворотке крови не выявлено.

Экспрессию маркера пролиферации Ki-67 оценивали в эпителиоцитах покровного эпите-

лия, в желудочных ямках и донных отделах желез слизистой оболочки желудка.

Через 2 месяца после лечения у пациентов в группах с хеликобактерной инфекцией отмечалось значимое ($p < 0,05$) снижение экспрессии Ki-67 в покровном эпителии (рис. 4).

При сопоставлении сывороточной концентрации показателей функциональной активности СОЖ и экспрессии маркера пролиферации Ki-67 у обследованных лиц до лечения выявлены значимые корреляции между уровнем ПГ II и экспрессией Ki-67 в донных отделах желез и покровном эпителии (табл.).

Также была установлена взаимосвязь между уровнем экспрессии антигена Ki-67 в покровном эпителии и донных отделах желез с уровнем антител к Hр.

Через 2 месяца и 1 год после лечения значимых корреляций между экспрессией Ki-67 и лабораторными показателями сывотки крови не определялось. Снижение экспрессии Ki-67 в покровном эпителии указывает на уменьшение пролиферативной активности в слизистой оболочке желудка.

Заключение

Таким образом, на основании результатов проведенного исследования можно сделать следующие выводы.

1. Эффективная эрадикационная терапия характеризуется достоверным снижением уровня антител класса IgG к *Helicobacter*

pylori в сывотке крови уже через 2 месяца лечения, а у пациентов с неэффективной эрадикацией уровень специфических антител остается высоким даже через 12 месяцев.

2. Достоверное снижение пепсиногена II и антител класса IgG к *Helicobacter pylori* в сывотке крови на фоне эрадикационной терапии сопровождается значимым снижением экспрессии Ki-67 в покровном эпителии, что указывает на уменьшение пролиферативной активности в слизистой оболочке желудка.
3. Прямая достоверная корреляция между концентрацией пепсиногена II и наличием нейтрофильной и лимфоплазмочитарной инфильтрацией в слизистой оболочке желудка является свидетельством того, что снижение концентрации пепсиногена II в течение 1 года после эрадикации *Helicobacter pylori* обусловлено в большей степени уменьшением активности воспалительных изменений в слизистой оболочке желудка, чем динамикой ее атрофических и метапластических изменений.
4. Выявлена обратная корреляция уровня пепсиногена I в сывотке крови с наличием атрофии и кишечной метаплазии в слизистой оболочке желудка, что позволяет использовать этот показатель для оценки риска пре- и неопластических изменений СОЖ у больных с хроническим хеликобактерным гастритом.

Список литературы/References

1. Исаков В.А., Домарадский И.В. Хеликобактериоз. М.: Медпрактика-М, 2003. 412 с. [Isakov V.A., Domaradsky I.V. *Helicobacter pylori*. Moscow: Medical Practice-M, 2003. 412 p. (In Russ.)]
2. Маев И.В., Зайратьянц О.В., Кучерявый Ю.А. Кишечная метаплазия слизистой оболочки желудка в практике гастроэнтеролога: современный взгляд на проблему // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2006. № 4. С. 38–48. [Maev I.V., Zairatyants O.V., Kucheryavy Yu. A. Intestinal metaplasia of the gastric mucosa in the practice of the gastroenterologist: a modern view on the problem. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii = Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*, 2006, no. 4, pp. 38–48. (In Russ.)]
3. Минушкин О.Н., Зверков И.В. Хронический гастрит // Лечащий врач. 2003. № 5. С. 24–31. [Minushkin O.N., Zverkov I.V. Chronic gastritis. *Lechashchiy vrach = The Attending Physician*, 2003, no. 5, pp. 24–31. (In Russ.)]
4. Пасечников В.Д., Чуков С.З. Доказательства *H. pylori*-ассоциированного желудочного канцерогенеза и разработка стратегий профилактики рака желудка // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2006. Т. 16, № 5. С. 82–89. [Pasechnikov V.D., Chukov S.Z. Evidence of *H. pylori*-associated gastric carcinogenesis and development of strategies for prevention of gastric cancer. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii = Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*, 2006, vol. 16, no. 5, pp. 82–89. (In Russ.)]
5. Слохова Н.К., Тотров И.Н. Изменения костной ткани при хронических заболеваниях желудка и тонкой кишки // Вестник молодого ученого. 2014. № 3–4. С. 13–15. [Slochova N.K., Totrov I.N. Changes of bone in chronic diseases of the stomach and small intestine. *Vestnik molodogo uchenogo = Bulletin of Young Scientist*, 2014, no. 3–4, pp. 13–15. (In Russ.)]
6. Успенская М.Н., Калиновский В.П., Ткаченко Е.И. Биохимические и иммунологические критерии оценки состояния слизистой оболочки желудка при ее опухолевой и неопухолевой патологии // Вопросы онкологии. 2007. Т. 53, № 3. С. 304–310. [Uspenskaja M.N., Kalinowski V.P., Tkachenko E.I. Biochemical and immunological criteria for assessing the condition of the mucous membrane of the stomach in its oncological and non-oncological disease. *Voprosy onkologii = Problems of Oncology*, 2007, vol. 53, no. 3, pp. 304–310. (In Russ.)]
7. Megraud F. Management of *Helicobacter pylori* infection. Maastricht-3. Guidelines for *Helicobacter pylori*. 13 United European Gastroenterology Week. Copenhagen, 2005, 64 p.

8. Wong B.C., Lam S.K., Wong W.M. Eradication *H. pylori* infection significantly slows down the progression of precancerous lesions in high risk population: a 5 year prospective randomized study. *Gastroenterology*, 2001, vol. 122 (suppl. 1), p. A588.
9. Xia H.H., Wong B.C. Nitric oxide in *Helicobacter pylori*-induced apoptosis and its significance in gastric carcinogenesis. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2003, vol. 18, pp. 1227–1230.

Авторы:

Дрыгина Л.Б., д.б.н., профессор, зав. клинико-диагностической лабораторией, ведущий научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ФГБУ Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург, Россия;
Эллиниди В.Н., к.м.н., доцент, зав. патологоанатомическим отделением ФГБУ Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург, Россия;
Бардышева Н.А., к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики отдела лабораторной диагностики ФГБУ Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург, Россия;
Богословский М.М., д.б.н., старший научный сотрудник НИО организации научной деятельности ФГБУ Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Drygina L.B., PhD, MD (Biology), Professor, Head of the Clinical Diagnostic Laboratory; Leading Researcher, Laboratory Diagnostics Department, Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, EMERCOM of Russia, St. Petersburg, Russian Federation;
Ellinidi V.N., PhD (Medicine), Associate Professor, Head of the Anatomic Pathology Department, Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, EMERCOM of Russia, St. Petersburg, Russian Federation;
Bardysheva N.A., PhD (Medicine), Pathologist, Laboratory Diagnostics Department, Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, EMERCOM of Russia, St. Petersburg, Russian Federation;
Bogoslovskiy M.M., PhD, MD (Biology), Senior Researcher, Department of Scientific Activity Organization, Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, EMERCOM of Russia, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 08.10.2018
Отправлена на доработку 18.03.2019
Принята к печати 12.04.2019

Received 08.10.2018
Revision received 18.03.2019
Accepted 12.04.2019

ИСХОДЫ ЗАБОЛЕВАНИЯ ТУБЕРКУЛЕЗОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНОТИПА *Mycobacterium tuberculosis*

О.А. Пасечник¹, А.А. Вязовая², М.А. Дымова³, А.И. Блох¹, В.Л. Стасенко¹,
М.П. Татаринцева⁴, И.В. Мокроусов²

¹ Омский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Омск, Россия

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

³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия

⁴ Клинический противотуберкулезный диспансер, г. Омск, Россия

Резюме. Штаммы *Mycobacterium tuberculosis*, относящиеся к разным генетическим группам или линиям, характеризуются вариабельностью ряда биологических свойств, что в известной мере определяет эпидемиологические и клинические особенности течения туберкулезного процесса у больных. Целью исследования являлась оценка риска неблагоприятного исхода заболевания у больных туберкулезом, вызванным различными генотипами возбудителя. **Материалы и методы.** В исследование были включены 425 больных туберкулезом органов дыхания, состоявших на диспансерном учете в медицинских организациях фтизиатрического профиля Омской области в период с марта 2015 г. по июнь 2017 г. Мужчины составили 73,1%, средний возраст 39,9 лет, средний возраст женщин 42 года. Культивирование *M. tuberculosis*, определение лекарственной чувствительности, выделение ДНК проведено стандартными методами. Принадлежность штаммов *M. tuberculosis* к генотипу Beijing и его эпидемиологически значимым кластерам B0/W148 и 94-32 определяли на основе анализа специфических маркеров с помощью ПЦР. Генотипирование штаммов других генотипов осуществляли методом сполитипирования. **Результаты.** 66,5% изолятов принадлежали генотипу Beijing, 12,8% — LAM, 10,1% — T, 4,7% — к генотипу Ural. Множественная лекарственная устойчивость к противотуберкулезным препаратам была обнаружена у 195 исследованных штаммов (45,9%). Штаммы генотипа Beijing чаще выделяли от больных мультирезистентным туберкулезом (PR = 2,09 (1,6–2,74) и туберкулезом, ассоциированным с ВИЧ-инфекцией (PR = 1,14; 95% ДИ 1,01–1,31). Летальный исход в 2 раза чаще регистрировался в группе больных, инфицированных микобактериями генотипа Beijing — 28,6% против 14,0% других генотипов. Риск смерти у больных туберкулезом связан с такими факторами, как молодой возраст в диапазоне от 18 до 44 лет (RR = 1,7; 95% ДИ 1,18–2,7), наличие коинфекции ВИЧ (RR = 5,0; 95% ДИ 3,39–7,45), наличие множественной (RR = 1,7; 95% ДИ 1,14–2,55) и широкой лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* (RR = 2,57; 95% ДИ 1,35–4,92), а также с генотипом Beijing штамма *M. tuberculosis*, вызвавшего заболевание туберкулезом (RR = 2,0; 95% ДИ 1,3–3,17). **Выводы.** Особенностью популяции *M. tuberculosis* на территории Омской области является значительное распространение штаммов генотипа Beijing, обладающих множественной и широкой лекарственной устойчивостью. Выявленная статистическая связь неблагоприятных исходов болезни с рядом факторов, включая принадлежность возбудителя к генотипу Beijing, требует разработки новых подходов в борьбе с туберкулезом.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, генотип, Beijing, лекарственная устойчивость, летальный исход.

Адрес для переписки:

Пасечник Оксана Александровна
644050, Россия, г. Омск, ул. Мира, 9, Омский государственный
медицинский университет.
Тел.: 8 (3812) 65-06-54 (служебн.); 8 906 197-41-87 (моб.).
E-mail: opasechnik@mail.ru

Contacts:

Oksana A. Pasechnik
644050, Russian Federation, Omsk, Mira str., 9,
Omsk State Medical University.
Phone: +7 (3812) 65-06-54 (office); +7 906 197-41-87 (mobile).
E-mail: opasechnik@mail.ru

Библиографическое описание:

Пасечник О.А., Вязовая А.А., Дымова М.А., Блох А.И., Стасенко В.Л., Татаринцева М.П., Мокроусов И.В. Исходы заболевания туберкулезом в зависимости от генотипа *Mycobacterium tuberculosis* // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 3–4. С. 531–538. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-531-538

© Пасечник О.А. и соавт., 2019

Citation:

Pasechnik O.A., Vyazovaya A.A., Dymova M.A., Blokh A.I., Stasenkov V.L., Tatarintseva M.P., Mokrousov I.V. Tuberculosis outcomes related to the *Mycobacterium tuberculosis* genotype // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 3–4, pp. 531–538. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-531-538

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2019-3-4-531-538>

TUBERCULOSIS OUTCOMES RELATED TO THE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* GENOTYPE**Pasechnik O.A.^a, Vyazovaya A.A.^b, Dymova M.A.^c, Blokh A.I.^a, Stasenko V.L.^a, Tatarintseva M.P.^d, Mokrousov I.V.^b**^a Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation^b St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation^c Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation^d Clinical Tuberculosis Dispensary, Omsk, Russian Federation

Abstract. *Mycobacterium tuberculosis* strains of different phylogenetic lineages and genetic families differ in biological properties that determine, to some extent, epidemiological features and clinical manifestation in tuberculosis (TB) patients. The aim of the study was to assess the risk of an adverse outcome of the disease in TB patients caused by various *M. tuberculosis* genotypes. **Materials and methods.** A total of 425 patients with respiratory TB were enrolled in this study. They were registered at phthisiatric facilities in the Omsk region from March 2015 to June 2017 period and included: males — 73.1%, mean age 39.9 years, females — 26.9%, mean age 42.0 years. *M. tuberculosis* culture and drug susceptibility testing and DNA extraction were performed in accordance with standard methods. Strains were assigned to the *M. tuberculosis* Beijing genotype and its epidemiologically relevant clusters B0/W148 and 94-32 by PCR based detection of specific markers. Non-Beijing strains were subjected to spoligotyping. **Results.** We found that 66.5% isolates belonged to the Beijing genotype, 12.8% — to LAM, 10.1% — to T, and 4.7% — to the Ural genotype. Multi-drug resistance (MDR) to anti-TB drugs was observed in 195 *M. tuberculosis* strains (45.9%). Moreover, Beijing genotype was more often isolated from patients with MDR-TB infection (PR = 2.09 (95% CI 1.6–2.74) and TB infection associated with HIV infection (PR = 1.14 (95% CI 1.01–1.31)). Lethal outcome was double higher in patients infected with Beijing vs. non-Beijing strains, 28.6% vs. 14.0% (PR = 2.03; 95% CI 1.3–3.17). The risk factors were identified as follows: young age 18–44 years (RR = 1.7; 95% CI 1.18–2.7), co-morbidity with HIV (RR = 5.0; 95% CI 3.39–7.45), multiple (RR = 1.7; 95% CI 1.14–2.55) and extensive drug resistance (RR = 2.57; 95% CI 1.35–4.92), and association with the Beijing genotype (RR = 2.0, 95% CI 1.3–3.17). **Conclusion.** *M. tuberculosis* spread in the Omsk region is characterised by significant prevalence of the Beijing genotype, associated with multiple and extensive drug resistance. A significant association of adverse clinical outcomes and various factors, including association with the Beijing genotype, requires development of new approaches in the fight against tuberculosis.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, genotype, Beijing, drug resistance, lethality outcome.

Введение

По данным ВОЗ, туберкулез является одной из 10 ведущих причин смерти в мире. Согласно оценкам в 2017 г. от туберкулеза умерли 1,3 млн ВИЧ-негативных лиц и более 300 000 случаев смерти было зарегистрировано среди больных туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией. В глобальных масштабах заболеваемость туберкулезом уменьшается примерно на 2% в год, при этом 16% больных туберкулезом ежегодно умирают от этого заболевания [1].

Первый этап Стратегии Всемирной организации здравоохранения по ликвидации туберкулеза предполагает достижение к 2025 г. контрольных показателей, направленных на снижение смертности больных туберкулезом на 75%, а заболеваемости на 50% в сравнении с уровнем 2015 г. [3].

Существующие стратегии борьбы с туберкулезом и модели трансмиссии возбудителя туберкулеза в значительной степени основываются на идее, что штаммы или субклоны *Mycobacterium tuberculosis* существенно не различаются по основным биологическим свойствам [9]. Однако многочисленные исследования, посвященные

изучению молекулярно-генетических особенностей циркулирующих штаммов *M. tuberculosis*, проведенные в последнее десятилетие в различных регионах мира, позволили выявить значительное генетическое разнообразие возбудителя туберкулеза. Вместе с тем было установлено, что штаммы *M. tuberculosis*, относящиеся к разным генетическим группам или линиям, характеризует вариабельность ряда биологических свойств, что в известной мере определяет эпидемиологические и клинические особенности течения туберкулезного процесса [6]. Некоторые генетические линии *M. tuberculosis*, в частности, Восточно-Азиатская (линия 2) и Евро-Американская (линия 4) линии наиболее широко распространены в мире. Штаммы Восточно-Азиатской линии, включающей генетическое семейство Beijing, преобладают в Центральной Азии, России и Южной Африке. Евро-Американскую линию представляют генетические семейства — LAM, T, Haarlem, Ural, X, S и др., распространенные в странах Азии, Европы, Африки и Америки [9, 14, 16]. Полагают, что принадлежность возбудителя к определенному генотипу *M. tuberculosis* может влиять на клиническое течение и исход туберкулезной инфекции [7, 9, 14].

Таким образом, оценка клинической и эпидемиологической значимости генотипов *M. tuberculosis* в целом и отдельных сублиний в частности способствует совершенствованию стратегии борьбы с туберкулезом [6, 9, 13].

Целью исследования являлась оценка риска неблагоприятного исхода заболевания у больных туберкулезом, вызванным различными генотипами возбудителя.

Материалы и методы

Выборка пациентов сформирована в период с марта 2015 г. по июнь 2017 г., последовательно были включены 425 больных туберкулезом органов дыхания, состоявших на диспансерном учете в медицинских организациях фтизиатрического профиля Омской области. Мужчины составили 73,1% ($n = 311$), средний возраст 39,9 лет (от 18 до 78 лет), средний возраст женщин 42 года (от 20 до 86 лет). Городскими жителями были 56,4% ($n = 250$) пациентов; у 35,2% ($n = 150$) установлено наличие ВИЧ-инфекции. Инfiltrативный туберкулез был диагностирован у 72,9% ($n = 310$), диссеминированный туберкулез — у 13,1% ($n = 56$), фиброзно-кавернозный — у 6,3% ($n = 27$), генерализованный — у 1,4% ($n = 6$) больных. Исход заболевания туберкулезом был оценен по состоянию на 01.07.2018 г.

Культивирование *M. tuberculosis* и определение лекарственной чувствительности (ЛЧ) изолятов к основным противотуберкулезным препаратам (ПТП) были проведены стандартным непрямом методом абсолютных концентраций и/или с помощью автоматизированной системы ВАСТЕС MGIT 960. Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) к противотуберкулезным препаратам была обнаружена у 195 исследованных штаммов (45,9%).

Образцы ДНК были выделены из чистых культур *M. tuberculosis* по ранее описанной методике [15]. Для определения принадлежности штаммов *M. tuberculosis* к генотипу Beijing использована полимеразная цепная реакция (ПЦР), позволяющая выявить специфическую вставку элемента IS6110 в локусе генома *dnaA-dnaN* [10]. Выявление кластера B0/W148 генотипа Beijing проводили с помощью мультиплексной ПЦР, определяя наличие специфической инсерции IS6110 в межгенном участке *Rv2664-Rv2665* [11].

Кластер 94–32 генотипа Beijing определяли методом ПЦР-ПДРФ (RFLP — Restriction Fragment Length Polymorphism — полиморфизм длин рестрикторных фрагментов), анализируя однонуклеотидный полиморфизм — мутация G>A в гене *sigE* кодон 98CTG>СТА, позиция в гене 294 [12]. Дифференциацию генотипа Beijing на современную и древнюю

сублинии осуществляли путем определения полиморфизма локуса NTF (наличие или отсутствие вставки IS 6110) и делеции RD181 [12]. Генотипирование штаммов non-Beijing (других генотипов) осуществляли методом сполитипирования [8]. Принадлежность штамма к определенному сполитипу, генетическому семейству (линии) устанавливали согласно международным базам данных SITVIT_WEB (http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE).

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили с использованием программного пакета Statistica 6.0 (Statsoft Inc.). Были рассчитаны такие показатели, как отношение превалентности (PR — prevalence ratio) и относительный риск (RR — relative risk) и их доверительные интервалы. Отношение превалентности позволило провести анализ демографических и клинических данных пациентов среди двух основных групп (Beijing и non-Beijing). Для установления связи неблагоприятного исхода и ряда факторов был рассчитан относительный риск. Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ОмГМУ (№ 66 от 30.01.15 г.).

Результаты

Для изучения исхода заболевания туберкулезом выделены две группы больных: I группа — 283 пациента (66,5%), от которых выделены штаммы *M. tuberculosis* семейства Beijing; II группа — 142 пациента, инфицированных микобактериями других генотипов, «non-Beijing» (LAM, T, Haarlem, Ural и др.) (табл. 1). Как видно из таблицы 1, в распределении случаев заболевания туберкулезом, вызванных штаммами генотипов Beijing и non-Beijing, по полу и месту проживания значимых различий не выявлено. Вместе с тем штаммы генотипа Beijing чаще выявляли у лиц более молодого возраста. При этом средний возраст больных туберкулезом, инфицированных штаммами Beijing, составлял $39,26 \pm 11,75$ лет против $42,92 \pm 15,18$ лет для штаммов non-Beijing, разность средней — 3,66 (95%ДИ 1,03–6,28). Доля случаев туберкулеза в возрасте 55 лет и старше была больше во II группе и составила 21,8% против 12,0% в I группе.

Штаммы генотипа Beijing чаще выделяли от больных мультирезистентным туберкулезом (PR = 2,09 (1,6–2,74) и туберкулезом, ассоциированным с ВИЧ-инфекцией (PR = 1,14 (95%ДИ 1,01–1,31)).

Хотя структура клинических форм туберкулеза органов дыхания у исследуемых больных

Таблица 1. Клинико-эпидемиологическая характеристика больных туберкулезом, вызванным штаммами *M. tuberculosis* различных генотиповTable 1. Clinical and epidemiological characteristics of patients with tuberculosis caused by *M. tuberculosis* strains belonging to diverse genotypes

Характеристики Characteristics	Генотип Beijing Beijing Genotype N, абс./abs. (%)	Генотипы non- Beijing non-Beijing Genotype N, абс./abs. (%)	PR (95% CI)
Всего/All	283 (100)	142 (100)	
Пол/Sex			
Мужчины males	205 (72,4)	106 (74,6)	0,96 (0,83–1,12)
Женщины females	78 (27,6)	36 (25,4)	1
Возраст/Age			
18–34 года 18–34 years	113 (39,9)	53 (37,3)	1,3* (1,01–1,67)
35–44 года 35–44 years	98 (34,6)	42 (29,6)	1,34* (1,01–1,67)
45–54 года 45–54 years	38 (13,4)	16 (11,3)	1,35* (1,01–1,8)
55 и старше > 55 years	34 (12,0)	31 (21,8)	1
Место проживания/Place of residence			
Городские жители Urban residents	160 (56,5)	80 (56,3)	1,0 (0,88–1,15)
Сельские жители Rural residents	123 (43,4)	62 (43,7)	1
ВИЧ-статус/HIV status			
Положительный Positive	109 (38,5)	41 (28,9)	1,14* (1,01–1,31)
Отрицательный Negative	174 (61,5)	101 (71,1)	1
Клинические формы туберкулеза/Clinical forms of tuberculosis			
Очаговый туберкулез легких Focal pulmonary tuberculosis	4 (1,4)	2 (1,4)	1,02 (0,19–5,5)
Инфильтративный туберкулез легких Infiltrative pulmonary tuberculosis	205 (72,4)	105 (73,9)	1
Фиброзно-кавернозный туберкулез Fibro-cavernous tuberculosis	18 (6,4)	9 (6,3)	1,02(0,47–2,2)
Диссеминированный туберкулез легких Disseminated pulmonary tuberculosis	39 (13,8)	17 (11,9)	1,15 (0,68–1,94)
Генерализованный туберкулез Generalized tuberculosis	5 (1,8)	1 (0,7)	2,52 (0,3–21,33)
Прочие Other	12 (4,2)	8 (5,6)	0,78 (0,33–1,86)
Структура лекарственной устойчивости <i>M. tuberculosis</i>/Structure of drug resistance in <i>M. tuberculosis</i>			
МЛУ MDR	154 (54,4)	41 (28,9)	2,09* (1,6–2,74)
Другие виды ЛУ (моно-, полирезистентность) Mono-, poly-drug resistance	48 (17,0)	11 (7,7)	3,42* (1,87–6,23)
Чувствительность ко всем противотуберкулезным препаратам Sensitivity to anti-TB drugs	81 (28,6)	90 (63,4)	1
Летальный исход Lethal outcome	81 (28,6)	20 (14,0)	2,03* (1,3–3,74)

Примечание. * статистически значимые различия.

Note. * significant differences are denoted.

ДИ 1,14–2,55 и 2,57; 95%ДИ 1,35–4,92), а также с генотипом Beijing штамма *M. tuberculosis*, вызвавшего заболевание туберкулезом (RR = 2,0, 95%ДИ 1,3–3,17).

Обсуждение

Сочетание молекулярно-генетических методов исследования возбудителя туберкулеза с эпидемиологическим анализом дает новый инструмент для оценки возможных ассоциаций между генотипом штаммов *M. tuberculosis* и клинико-эпидемиологическими характеристиками случаев заболевания [9].

Штаммы различных генетических линий *M. tuberculosis* демонстрируют вариабельность ряда биологических свойств (скорость роста на питательных средах, вирулентность для лабораторных животных). Установлена ассоциация генотипа некоторых штаммов линий 2 и 4 с тяжестью клинического течения заболевания и повышенной трансмиссивностью при передаче от человека к человеку [5, 6, 9, 13].

Исход заболевания туберкулезом, благоприятный или неблагоприятный, зависит от ряда факторов, действующих независимо или оказывающих сочетанное влияние — к ним относятся не только вирулентность микроорганизма,

Таблица 4. Факторы, ассоциированные с риском неблагоприятного исхода заболевания туберкулезом

Table 4. Factors associated with the risk of adverse outcome in tuberculosis patients

	Умершие Deceased N = 101	Состоящие под диспансерным наблюдением Patients at the dispensary observation N = 324	RR (95%CI)
Пол Sex			
Мужчины males	74 (73,2)	237 (73,1)	1,0 (0,68–1,47)
Женщины females	27 (26,8)	87 (26,9)	1
Возраст, лет Age,			
18–44 года 18–44 years	77 (76,2)	196 (60,5)	1,7* (1,18–2,7)
45 и старше > 45 years	24 (27,3)	128 (39,5)	1
ВИЧ-статус HIV status			
Положительный positive	74 (73,2)	76 (23,4)	5,0* (3,39–7,45)
Отрицательный negative	27 (26,8)	248 (76,6)	1
Чувствительность к противотуберкулезным препаратам Sensitivity to anti-tuberculosis drugs			
ЛЧ Sensitivity	29 (28,7)	142 (43,8)	1
Полирезистентность Poly-drug resistance	12 (11,9)	43 (13,3)	1,28 (0,7–2,34)
МЛУ MDR	53 (52,5)	130 (40,1)	1,7* (1,14–2,55)
ШЛУ XDR	7 (6,9)	9 (2,8)	2,57* (1,35–4,92)
Генотипы <i>M. tuberculosis</i> Genotypes of <i>M. tuberculosis</i>			
Beijing	81 (80,1)	202 (62,3)	2,0* (1,3–3,17)
non-Beijing	20 (19,9)	122 (37,7)	1

Примечание. * статистически значимые различия.

Note. * significant differences are denoted.

но и особенности полиморфизма генов человека, наличие ВИЧ-инфекции, иммуносупрессии, длительность течения заболевания туберкулезом, своевременность его выявления, эффективность лечения, а также социальные и экологические факторы [4, 5, 7, 14, 17]. Так, у больных, выделяющих *M. tuberculosis* генотипа Beijing, достоверно чаще развивается диссеминированная, фиброзно-кавернозная формы туберкулеза, а также казеозная пневмония [2].

В нашем исследовании на территории Омской области более половины (66,5%) изолятов *M. tuberculosis* принадлежали к генотипу Beijing Восточно-Азиатской линии. При этом более молодой возраст больных, инфицированных штаммами Beijing, свидетельствует о те-

кущей передаче возбудителя данного генотипа среди населения.

Летальный исход был зарегистрирован в 28,6% случаях инфицирования штаммами генотипа Beijing, в 2 раза превышая показатель у больных, выделяющих штаммы других генетических групп. При этом удельный вес больных, умерших от туберкулеза, не зависел от принадлежности штамма к определенной сублинии генотипа Beijing.

Штаммы генотипа Beijing чаще выделяли от больных мультирезистентным туберкулезом и туберкулезом, ассоциированным с ВИЧ-инфекцией. Перечисленные факторы были ассоциированы с риском неблагоприятного исхода болезни.

Список литературы/References

1. ВОЗ. Доклад о глобальной борьбе с туберкулезом 2018 год. [Global tuberculosis report 2018]. URL: https://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2018_executive_summary_ru.pdf?ua=1 (22.07.2019)
2. Исаева Т.Х., Васильева И.А., Черноусова Л.Н. Особенности течения впервые выявленного туберкулеза легких в зависимости от генотипа *M. tuberculosis* // Инфекционные болезни. 2011. Т. 9, № 2. С. 68–72. [Isaeva T.Kh., Vasileva I.A., Chernousova L.N. Specificities of the course of pulmonary tuberculosis depending on the genotype of *M. tuberculosis*. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2011, vol. 9, no. 2, pp. 68–72. (In Russ.)]
3. Стратегия ВОЗ по ликвидации туберкулеза: цели и показатели. [The End TB Strategy]. URL: <https://www.who.int/tb/strategy/end-tb/ru> (22.07.2019)
4. Caws M., Thwaites G., Stepienwska K., Nguyen T.N., Nguyen T.H., Nguyen T.P., Mai N.T., Phan M.D., Tran H.L., Tran T.H., van Soolingen D., Kremer K., Nguyen V.V., Nguyen T.C., Farrar J. Beijing genotype of *Mycobacterium tuberculosis* is significantly associated with human immunodeficiency virus infection and multidrug resistance in cases of tuberculous meningitis. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, vol. 44, no. 11, pp. 3934–3939. doi: 10.1128/JCM.01181-06
5. Coscolla M. Biological and epidemiological consequences of MTBC Diversity. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2017, vol. 1019, pp. 95–116. doi: 10.1007/978-3-319-64371-7_5
6. Coscolla M., Gagneux S. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Semin. Immunol.*, 2014, vol. 26, no. 6, pp. 431–444. doi: 10.1016/j.smim.2014.09.012
7. Folkvardsen D.B., Norman A., Andersen Å.B., Rasmussen E.M., Lillebaek T., Jelsbak L. A major *Mycobacterium tuberculosis* outbreak caused by one specific genotype in a low-incidence country: Exploring gene profile virulence explanations. *Sci. Rep.*, 2018, vol. 8, no. 1, p. 11869. doi: 10.1038/s41598-018-30363-3
8. Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A., van Agterveld M., van Soolingen D., Kuijper S., Bunschoten A., Molhuizen H., Shaw R., Goyal M., van Embden J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, vol. 35, no. 4, pp. 907–914.
9. Kong Y., Cave M.D., Zhang L., Foxman B., Marrs C.F., Bates J.H., Yang Z.H. Association between *Mycobacterium tuberculosis* Beijing/W lineage strain infection and extrathoracic tuberculosis: insights from epidemiologic and clinical characterization of the three principal genetic groups of *M. tuberculosis* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 2007, vol. 45, no. 2, pp. 409–414. doi: 10.1128/JCM.01459-06
10. Mokrousov I., Vyazovaya A., Zhuravlev V., Otten T., Millet J., Jiao W.W., Shen A.D., Rastogi N., Vishnevsky B., Narvskaya O. Realtime PCR assay for rapid detection of epidemiologically and clinically significant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 2014, vol. 52, pp. 1691–1693. doi: 10.1128/JCM.03193-13
11. Mokrousov I., Narvskaya O., Vyazovaya A., Otten T., Jiao W.W., Gomes L.L., Suffys P.N., Shen A.D., Vishnevsky B. Russian “successful” clone B0/W148 of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: multiplex PCR assay for rapid detection and global screening. *J. Clin. Microbiol.*, 2012, vol. 50, no. 11, pp. 3757–3759. doi: 10.1128/JCM.02001-12
12. Mokrousov I., Chernyaeva E., Vyazovaya A., Skiba Y., Solovieva N., Valcheva V., Levina K., Malakhova N., Jiao W.W., Gomes L.L., Suffys P.N., Kütt M., Aitkhozhina N., Shen A.D., Narvskaya O., Zhuravlev V. Rapid assay for detection of the epidemiologically important Central Asian/Russian strain of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype. *J. Clin. Microbiol.*, 2018, vol. 24, no. 56 (2): e01551-17. doi: 10.1128/JCM.01551-17
13. Ribeiro S.C., Gomes L.L., Amaral E.P., Andrade M.R., Almeida F.M., Rezende A.L., Lanes V.R., Carvalho E.C., 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. doi: 10.1128/JCM.00498
14. Thwaites G., Caws M., Chau T.T., D’Sa A., Lan N.T., Huyen M.N., Gagneux S., Anh P.T., Tho D.Q., Torok E., Nhu N.T., Duyen N.T., Duy P.M., Richenberg J., Simmons C., Hien T.T., Farrar J. Relationship between *Mycobacterium tuberculosis* genotype and the clinical phenotype of pulmonary and meningeal tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, 2008, vol. 46, no. 4, pp. 1363–1368. doi: 10.1128/JCM.02180-07

15. 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 on Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol.*, 1993, vol. 31, pp. 406–409.
16. Viegas S.O., Machado A., Groenheit R., Ghebremichael S., Pennhag A., Gudo P.S., Cuna Z., Langa E., Miotto P., Cirillo D.M., Rastogi N., Warren R.M., van Helden P.D., Koivula T., Källenius G. Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype is associated with HIV infection in Mozambique. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 8: e71999. doi:10.1371/journal.pone.0071999
17. Wada T., Iwamoto T., Maeda S. Genetic diversity of the Mycobacterium tuberculosis Beijing family in East Asia revealed through refined population structure analysis. *FEMS Microbiol Lett.*, 2009, vol. 291, no. 1, pp. 35–43. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01431.x

Авторы:

Пасечник О.А., к.м.н., старший преподаватель кафедры эпидемиологии ФГБОУ ВО Омский государственный медицинский университет, г. Омск, Россия;
Вязовая А.А., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Дымова М.А., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия;
Блох А.И., ассистент кафедры эпидемиологии ФГБОУ ВО Омский государственный медицинский университет, г. Омск, Россия;
Татаринцева М.П., главный врач БУЗОО Клинический противотуберкулезный диспансер, г. Омск, Россия;
Стасенко В.Л., д.м.н., профессор, зав. кафедрой эпидемиологии Омского государственного медицинского университета, г. Омск, Россия;
Мокроусов И.В., д.б.н., зав. лабораторией молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Pasechnik O.A., PhD (Medicine), Senior Lecturer, Department of Epidemiology, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation;
Vyazovaya A.A., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Dymova M.A., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Biotechnology, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences
Blokh A.I., Assistant Professor, Department of Epidemiology, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation;
Tatarintseva M.P., Head of the Clinical Tuberculosis Dispensary, Omsk, Russian Federation;
Stasenko V.L., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Epidemiology, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation;
Mokrousov I.V., PhD, MD (Biology), Head of the Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 21.11.2018
 Отправлена на доработку 13.03.2019
 Принята к печати 18.03.2019

Received 21.11.2018
 Revision received 13.03.2019
 Accepted 18.03.2019

ФЕНОТИП НК-КЛЕТОК В ДИНАМИКЕ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОГО ПЕРИОДА У БОЛЬНЫХ ПЕРИТОНИТОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИСХОДА ЗАБОЛЕВАНИЯ

А.А. Савченко¹, А.Г. Борисов¹, И.В. Кудрявцев^{2,3}, 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 ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

³ ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Целью исследования явилось изучение фенотипа НК-клеток в крови у больных распространенным гнойным перитонитом (РГП) в динамике послеоперационного периода в зависимости от исхода заболевания. Обследовано 48 пациентов с острыми хирургическими заболеваниями и травмами органов брюшной полости, осложнившимися РГП, в возрасте 30–63 лет. Забор крови производили перед операцией (дооперационный период), а также на 7, 14 и 21 сутки послеоперационного периода. В качестве контроля обследовано 67 относительно здоровых людей аналогичного возрастного диапазона. Исследование фенотипа НК-клеток крови проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови. По средней интенсивности флуоресценции оценивались уровни экспрессии рецепторов на мембране НК-клеток. Обнаружено, что у больных с благоприятным исходом РГП в дооперационном периоде снижено содержание зрелых НК-клеток. Восстановление количества НК-клеток у данной категории больных к концу послеоперационного периода (21 сутки после операции) осуществляется за счет повышения уровней зрелых, цитотоксических и цитокин-продуцирующих клеток. При благоприятном исходе заболевания к концу послеоперационного периода среди всех исследуемых субпопуляций НК-клеток крови повышается доля с экспрессией CD11b-рецептора и увеличивается количество CD57⁺ НК-клеток относительно дооперационного уровня. У больных с неблагоприятным исходом РГП в дооперационном и в течение всего послеоперационного периода выявляется снижение содержания зрелых НК-клеток как относительно показателей здоровых людей, так и пациентов с благоприятным исходом заболевания. При неблагоприятном исходе РГП к концу наблюдаемого периода повышается уровень цитотоксических НК-клеток в крови. У данной категории больных в дооперационном периоде и после операции доля зрелых НК-клеток с экспрессией CD11b снижается. В течение всего послеоперационного периода при неблагоприятном исходе заболевания понижено содержание CD57⁺ НК-клеток как относительно контрольного диапазона, так и количества в крови у больных с благоприятным исходом РГП. В то же время у больных с неблагоприятным исходом данного инфекционно-воспалительного заболевания на НК-клетках крови повышается уровень экспрессии CD28 и CD57. Выявленные особенности фенотипа НК-клеток крови при неблагоприятном исходе заболевания отражают нарушения в механизмах созревания и миграции НК-клеток, что, в свою очередь, определяет расстройство процессов регулирования острой воспалительной реакции при РГП.

Ключевые слова: перитонит, исход заболевания, НК-клетки, активационные маркеры, адгезионные рецепторы, дооперационный период, послеоперационное лечение.

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., Кудрявцев И.В., Беленюк В.Д. Фенотип НК-клеток в динамике послеоперационного периода у больных перитонитом в зависимости от исхода заболевания // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 3–4. С. 539–548. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-539-548

Citation:

Savchenko A.A., Borisov A.G., Kudryavtsev I.V., Belenjuk V.D. The phenotype of NK-cells in the dynamics of the post-operative period in patients with peritonitis in depending on the outcome of the disease // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 3–4, pp. 539–548. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-539-548

THE PHENOTYPE OF NK-CELLS IN THE DYNAMICS OF THE POST-OPERATIVE PERIOD IN PATIENTS WITH PERITONITIS IN DEPENDING ON THE OUTCOME OF THE DISEASE

Savchenko A.A.^a, Borisov A.G.^a, Kudryavcev I.V.^{b,c}, Belenjuk V.D.^a

^a 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 Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. Our study was aimed at investigating dynamic phenotype pattern of peripheral blood NK cells in patients with widespread purulent peritonitis (WPP) during postoperative period depending on disease outcome. A total of 48 patients aged 30–63 with acute surgical diseases and abdominal injuries complicated by WPP were examined. Blood sampling was performed before surgery (preoperative period) as well as on day 7, 14 and 21 during postoperative period. 40 apparently healthy age-matched subjects were included in control group. Peripheral blood NK cell phenotyping was performed by using flow cytometry with directly immunofluorescently tagged antibodies. Mean fluorescence intensity was measured to estimate expression levels of NK cell surface receptors was measured. It was found that in patients with a favorable WPP outcome during preoperative period the percentage of mature NK cells was decreased that was restored by the end of the postoperative period (21 days post-surgery) due to elevated mature, cytotoxic and cytokine-producing NK cell subsets. In addition, percentage of CD11b-positive NK cell subsets was increased upon favorable outcome by the end of postoperative period as well as frequency of CD57-positive NK cells relative to the preoperative period. However, frequency of mature NK cells with unfavorable WPP outcome vs. control vs. favorable outcome was decreased during preoperative and entire postoperative period. Moreover, amount of cytotoxic NK cells was elevated during examination period upon unfavorable WPP outcome. Further, percentage of mature CD11b-positive NK cells in this patient cohort was decreased during preoperative period and post-surgery. Percentage of CD57-positive NK cells was decreased during entire postoperative period in patients with unfavorable vs. favorable outcome vs. control group. At the same time, patients with unfavorable outcome of this infectious-inflammatory disease were shown to display upregulated expression of CD28 and CD57 markers on NK cells. Such features identified in phenotype of peripheral blood NK cells in patients with unfavorable WPP outcome reflect abnormal mechanisms in NK cell maturation and migration, which, in turn, determines disturbance in events regulating acute inflammatory reaction in WPP.

Key words: peritonitis, outcome of the disease, NK-cells, activation markers, adhesion receptors, preoperative period, postoperative treatment.

Введение

НК-клетки (Natural Killer) определяются как отдельная популяция лимфоцитов, осуществляющая функции врожденного иммунитета. Основной функцией НК-клеток, которая была первоначально определена, является цитолитическая активность без предшествующей стимуляции вирусинфицированных и некоторых опухолевых клеток [6, 7, 15]. Однако в настоящее время у НК-клеток также выделяют и функцию регуляции врожденного и адаптивного иммунитета за счет секреции широкого спектра цитокинов и хемокинов [12, 13, 16]. В частности, в исследовании Anuforo O.U.U. и соавт. (2018) показано, что при антигениндуцированном воспалении НК-клетки осуществляют поддержание апоптоза и регулируют функциональную активность нейтрофилов [9]. Кроме того, выявление различных субпопуляций НК-клеток позволяет расширить их роль в реализации иммунного ответа [2, 16, 24]. В связи с этим появляются исследования фенотипического состава и особенностей функциональной активности НК-клеток при различных воспалительных заболеваниях. Так, в работе Rasid O. и соавт. (2016) показано, что при системной воспалительной реакции из-

меняется уровень экспрессии маркеров активации (CD25 и CD69) и повышается синтез ряда эффекторных молекул (IFN γ , гранзим В и IL-10) [26]. Доказана регуляторная роль НК-клеток при инфекции *Salmonella Typhimurium* [22]. При снижении их количества активность воспалительного процесса в слизистой оболочке кишечника снижается.

Распространенный гнойный перитонит (РГП) является одним из проблемных вопросов современного здравоохранения. Несмотря на новые разработанные хирургические и медикаментозные методы лечения РГП, летальность при данном заболевании остается высокой, достигая 75,8–100% при развитии различных осложнений, например, сепсиса [1, 3, 20]. На сегодняшний день доказано, что характер течения РГП, а также механизм развития осложнений определяется не только применяемыми хирургическими методами и качеством послеоперационного лечения, но и зависит от состояния иммунной системы пациента [3, 5, 27]. Однако роль НК-клеток при РГП до сих пор изучена слабо.

Целью исследования явилось изучение фенотипа НК-клеток в крови у больных РГП в динамике послеоперационного периода в зависимости от исхода заболевания.

Материалы и методы

На базе Красноярского краевого гнойно-септического центра КГБУЗ «Краевая клиническая больница» обследовано 48 пациентов с острыми хирургическими заболеваниями и травмами органов брюшной полости, осложнившимися РГП, в возрасте 30–63 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 67 относительно здоровых людей аналогичного возрастного диапазона.

Исследование фенотипа NK-клеток 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: CD16-FITC/CD56-PE/CD45-ECD/CD11b-PC7 и CD57-FITC/CD28-PE/CD16+56-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 [4]. Пробоподготовку осуществляли по стандартной методике [33]. 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 показателя-

ми 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

При исследовании фенотипа NK-клеток крови у больных с благоприятным исходом РГП обнаружено, что в дооперационном периоде у обследованных пациентов на фоне снижения абсолютного количества лимфоцитов понижается процентный уровень CD16⁺/56⁺- и CD16⁺CD56⁺-клеток (табл. 1). Количество лимфоцитов у пациентов данной группы относительно исходных значений повышается уже на 7 сутки послеоперационного периода, контрольных значений достигает на 21 сутки после операции. Процентное содержание CD16⁺/56⁺-клеток при благоприятном исходе остается сниженным относительно контрольных значений в течение двух недель послеоперационного периода и повышается до контрольных значений на 21 сутки после операции. В то же время количество CD16⁺CD56⁺-клеток у больных РГП с благоприятным исходом на 7 и 14 сутки послеоперационного лечения соответствуют контрольному уровню и более чем в 2 раза превышают его к концу наблюдаемого периода. Процентное содержание CD16⁺CD56⁻- и CD16⁻CD56⁺-клеток при благоприятном исходе заболевания повышены относительно контрольных значений на 7 и 21 сутки послеоперационного периода.

На 21 сутки послеоперационного периода в крови у больных РГП с благоприятным исходом повышается содержание CD16⁺CD56⁺CD11b⁺-клеток как относительно контрольного диапазона, так и исходных значений (табл. 2). Относительное содержание CD16⁺/56⁺CD57⁺-клеток также повышается к концу наблюдаемого периода, однако только в сравнении с исходным уровнем. Относительно контрольных значений у пациентов данной группы в период на 7 и 21 сутки после операции в крови увеличивается количество CD16⁺CD56⁻CD11b⁺- и CD16⁻CD56⁺CD11b⁺-клеток.

У больных РГП с неблагоприятным исходом РГП абсолютное содержание общих лимфоцитов в крови снижено относительно контрольных значений еще в дооперационном периоде и восстанавливается только к 21 суткам после операции (табл. 3). В течение всего периода обследования у пациентов данной группы понижено относительное количество CD16⁺/56⁺-

и CD16⁺CD56⁺-клеток. К концу периода наблюдения повышается относительно контрольного диапазона содержание CD16⁺CD56⁻-клеток.

Содержание CD16⁺CD56⁺CD11b⁺-клеток у больных с неблагоприятным исходом РГП понижено относительно контрольного диапазона в дооперационном периоде и до конца наблюдаемого периода (табл. 4). Кроме того, у лиц данной группы на 7 сутки послеоперационного периода снижается количество CD16⁺/56⁺CD57⁺-клеток и остается на пониженном уровне до конца наблюдаемого периода.

При сравнении фенотипического состава NK-клеток у больных в зависимости от исхода РГП обнаружено, что уже в дооперационном периоде при неблагоприятном исходе заболевания в крови снижено относительное количество CD16⁺/56⁺- (p = 0,031), CD16⁺CD56⁺- (p = 0,045), CD16⁻CD56⁺- (p = 0,028), CD16⁺CD56⁺CD11b⁺- (p = 0,036) и CD16⁻CD56⁺CD11b⁺-клетки (p = 0,048) (см. табл. 1, 2, 3 и 4). На 7 сутки послеоперационного периода у больных с неблагоприятным исходом РГП по сравнению с благоприятным исходом заболевания сохраняется пониженное содержание CD16⁺CD56⁺- (p = 0,028), CD16⁻

CD56⁺- (p = 0,047), CD16⁺CD56⁺CD11b⁺- (p = 0,007) и CD16⁻CD56⁺CD11b⁺-клеток (p = 0,024). Также в этот период наблюдения при неблагоприятном исходе снижены уровни CD16⁺CD56⁻CD11b⁺- (p = 0,027) и CD16⁺/56⁺CD57⁺- (p = 0,042). На 14 сутки послеоперационного периода при неблагоприятном исходе РГП в крови понижено количество CD16⁺/56⁺- (p = 0,037), CD16⁺CD56⁺- (p = 0,040), CD16⁺CD56⁺CD11b⁺- (p = 0,041) и CD16⁺/56⁺CD57⁺-клеток (p = 0,038). На 21 сутки послеоперационного периода у больных с неблагоприятным исходом РГП по сравнению с благоприятным исходом заболевания CD16⁺/56⁺- (p = 0,025), CD16⁺CD56⁺- (p = 0,046), CD16⁺CD56⁺CD11b⁺- (p = 0,041), CD16⁺CD56⁻CD11b⁺- (p = 0,044) и CD16⁺/56⁺CD57⁺-клеток (p = 0,027).

По сравнению с контрольными значениями NK-клетки больных с неблагоприятным исходом РГП интенсивнее экспрессируют CD28-рецептор на 7 и 14 сутки и CD57-маркер на 7 и 21 сутки послеоперационного периода (табл. 5). При этом выявляются различия по уровням экспрессии активационных маркеров в зависимости от исхода заболевания.

Таблица 1. Содержание NK-клеток в крови у больных с благоприятным исходом РГП в динамике послеоперационного периода (Me, Q1 – Q3)

Table 1. The content of blood NK-cells in patients with a favorable outcome of WPP in the dynamics of the postoperative period (Me, Q1 – Q3)

Показатели Parameters	Контроль Control n = 67	Дооперационный период Preoperative period n = 27	7 сутки после операции 7 days after surgery n = 27	14 сутки после операции 14 days after surgery n = 27	21 сутки после операции 21 days after surgery n = 27
Лимфоциты, 10 ⁹ /л Lymphocytes, 10 ⁹ /L	2,05 1,56–2,60	1,06 0,78–1,33	1,32 0,83–2,53	1,34 0,90–2,08	2,15 1,35–3,89
		p ₁ < 0,001	p ₁ = 0,007 p ₂ = 0,017	p ₁ = 0,007 p ₂ = 0,042	p ₂ = 0,005
CD16/56 ⁺ , %	16,2 11,0–21,0	6,3 3,6–11,6	9,4 5,6–13,7	10,5 6,2–12,5	17,3 7,3–22,5
		p ₁ < 0,001	p ₁ < 0,001	p ₁ = 0,048	p ₂ = 0,038 p ₃ = 0,045
CD16 ⁺ CD56 ⁺ , %	7,9 5,6–14,9	5,6 2,9–10,0	8,8 5,1–13,0	9,8 3,3–22,9	16,6 7,6–22,4
		p ₁ = 0,041			p ₁ = 0,045 p ₂ = 0,018 p ₃ = 0,046
CD16 ⁺ CD56 ⁻ , %	0,33 0,21–0,57	0,53 0,17–0,83	0,67 0,51–1,16	0,48 0,25–1,29	0,89 0,59–1,20
			p ₁ < 0,001		p ₁ = 0,019
CD16 ⁻ CD56 ⁺ , %	0,28 0,17–0,53	0,33 0,22–0,45	0,52 0,27–1,10	0,43 0,23–0,92	0,49 0,26–0,72
			p ₁ = 0,007 p ₂ = 0,016		p ₁ = 0,044

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.

Таблица 2. Содержание NK-клеток, экспрессирующих активационные и адгезионные маркеры, у больных с благоприятным исходом РГП в динамике послеоперационного периода (Me, Q1 – Q3)

Table 2. The content of NK-cells expressing activation and adhesion markers in patients with a favorable outcome of WPP in the dynamics of the postoperative period (Me, Q1 – Q3)

Показатели Parameters	Контроль Control n = 67	Дооперационный период Preoperative period n = 27	7 сутки после операции 7 days after surgery n = 27	14 сутки после операции 14 days after surgery n = 27	21 сутки после операции 21 days after surgery n = 27
CD16⁺CD56⁺CD11b⁺, %	7,4 5,5–14,0	5,4 3,6–10,0	8,5 5,0–12,7	9,7 3,2–22,4	16,2 7,6–21,5
					p ₁ = 0,040 p ₂ = 0,022 p ₃ = 0,047
CD16⁺CD56⁻CD11b⁺, %	0,25 0,16–0,43	0,39 0,07–0,77	0,48 0,38–0,78	0,25 0,17–0,64	0,79 0,47–1,12
			p ₁ = 0,002		p ₁ = 0,012
CD16⁻CD56⁺CD11b⁺, %	0,26 0,16–0,47	0,30 0,19–0,43	0,48 0,24–1,09	0,29 0,22–0,51	0,42 0,26–0,64
			p ₁ = 0,008		p ₁ = 0,041
CD16/56⁺CD28⁺, %	0,58 0,21–1,82	0,66 0,09–1,07	0,57 0,17–1,30	0,49 0,13–0,91	0,46 0,19–0,59
CD16/56⁺CD57⁺, %	2,79 1,52–4,18	2,09 1,44–3,49	2,74 1,37–5,27	2,25 1,13–5,37	3,65 2,01–7,52
					p ₂ = 0,039 p ₃ = 0,047 p ₄ = 0,042

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; p₄ — статистически значимые различия с показателями больных на 14 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; p₄ — statistically significant differences versus 14 days after surgery patients.

Таблица 3. Количество NK-клеток в крови у больных с неблагоприятным исходом РГП в динамике послеоперационного периода (Me, Q1 – Q3)

Table 1. The number of blood NK-cells in patients with an unfavorable outcome of WPP in the dynamics of the postoperative period (Me, Q1 – Q3)

Показатели Parameters	Контроль Control n = 67	Дооперационный период Preoperative period n = 21	7 сутки после операции 7 days after surgery n = 17	14 сутки после операции 14 days after surgery n = 15	21 сутки после операции 21 days after surgery n = 12
Лимфоциты, 10⁹/л Lymphocytes, 10⁹/L	2,05 1,56–2,60	0,92 0,51–1,25	0,87 0,70–1,81	1,06 0,65–1,11	2,06 1,27–2,85
		p ₁ < 0,001	p ₁ < 0,001	p ₁ < 0,001	p ₂ = 0,008 p ₃ = 0,014 p ₄ = 0,041
CD16/56⁺, %	16,2 11,0–21,0	3,9 3,1–4,9	6,8 2,01–16,8	4,3 2,7–5,1	6,1 2,2–12,9
		p ₁ < 0,001	p ₁ = 0,006	p ₁ < 0,001	p ₁ = 0,017
CD16⁺CD56⁺, %	7,9 5,6–14,9	2,8 1,6–6,8	3,4 0,8–7,0	4,7 1,4–7,4	4,9 2,6–7,4
		p ₁ = 0,004	p ₁ = 0,010	p ₁ = 0,047	p ₁ = 0,048
CD16⁺CD56⁻, %	0,33 0,20–0,56	0,49 0,36–0,84	0,54 0,20–0,97	0,53 0,44–1,17	0,90 0,49–2,38
					p ₁ = 0,046
CD16⁻CD56⁺, %	0,28 0,165–0,53	0,17 0,08–0,23	0,18 0,08–0,90	0,26 0,25–0,99	0,63 0,44–1,53

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; p₄ — статистически значимые различия с показателями больных на 14 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; p₄ — statistically significant differences versus 14 days after surgery patients.

Уровень MFI CD28 более выражен на НК-клетках больных с неблагоприятным исходом в до- и в первые 2 недели послеоперационного периода. Более высокий уровень MFI CD57 также выявляется при неблагоприятном исходе на 7 и 21 сутки после операции.

Обсуждение

НК-клетки представляют собой гетерогенную популяцию, обладают естественной цитотоксической активностью и способны продуцировать цитокины и хемокины [6, 25, 34]. Иммунофенотипирование общей фракции НК-клеток и их основных субпопуляций осуществляли по маркерам CD16 и CD56. CD16 является низкоаффинным рецептором иммуноглобулинов G III типа (FcγRIII), с помощью которого осуществляется механизм клеточной цитотоксичности [2, 10, 23]. Маркер CD56 (NCAM, Leu-19, NKH-1) является гликопротеином, принадлежащим к суперсемейству иммуноглобулинов, и принимает участие в реализации межклеточных контактов [2, 21, 37]. При этом НК-клетки, активно экспрессирующие CD16 и CD56, определяются как зрелые. НК-клетки с фенотипом CD16⁻CD56⁺ проявляют цитотоксическую активность. НК-клетки с фенотипом CD16⁺CD56⁻ в ответ на стимуляцию IL-2 начинают секретировать широкий спектр цитокинов, но проявляют слабую цитолитическую активность (цитокинпродуцирующие) [2, 8, 17].

У больных РПП независимо от исхода заболевания относительное количество общих НК-клеток (CD16/56⁺) в крови снижено уже в дооперационном периоде, что проявляется на фоне понижения абсолютного уровня лимфоцитов в крови. К концу наблюдаемого периода содержание лимфоцитов нормализуется. В то же время количество НК-клеток до уровня контрольного диапазона восстанавливается только у больных с благоприятным исходом РПП к 21 суткам послеоперационного лечения. Более того, в течение всего периода обследования у пациентов с неблагоприятным исходом заболевания наблюдается низкий уровень НК-клеток по сравнению с выявленным у лиц с благоприятным исходом перитонита. Низкое содержание НК-клеток при перитоните может определяться двумя основными причинами. Во-первых, это миграция клеток в зону воспаления. В частности, на примере экспериментального перитонита показано, что уже через 48 ч развития заболевания количество мигрирующих в брюшную полость НК-клеток достигает максимума [35]. И, во-вторых, в работе Shindo Y. и соавт. (2017) показано, что на фоне развития экспериментальных острых воспалительных процессов НК-клетки интенсивнее экспрессируют рецептор PD-1 (programmed cell death-1) [29]. Высокий уровень экспрессии PD-1 авторы связывают со снижением количества НК-клеток и других лимфоцитов в крови. Причем блокирование экспрессии данного рецептора приводило к повышению выживаемости животных.

Таблица 4. Содержание НК-клеток, экспрессирующих активационные и адгезионные маркеры, у больных с неблагоприятным исходом РПП в динамике послеоперационного периода (Me, Q1 — Q3)

Table 4. The content of NK-cells expressing activation and adhesion markers in patients with an unfavorable outcome of WPP in the dynamics of the postoperative period (Me, Q1 — Q3)

Показатели Parameters	Контроль Control n = 67	Дооперационный период Preoperative period n = 21	7 сутки после операции 7 days after surgery n = 17	14 сутки после операции 14 days after surgery n = 15	21 сутки после операции 21 days after surgery n = 12
CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD11b ⁺ , %	7,4 5,5–14,0	2,7 1,6–6,4	3,4 0,7–6,8	4,4 1,2–6,6	4,3 0,6–6,5
		p ₁ = 0,005	p ₁ < 0,001	p ₁ = 0,048	p ₁ = 0,011
CD16 ⁺ CD56 ⁻ CD11b ⁺ , %	0,25 0,16–0,43	0,39 0,16–0,80	0,36 0,05–0,61	0,38 0,27–0,58	0,38 0,19–0,84
CD16 ⁻ CD56 ⁺ CD11b ⁺ , %	0,26 0,16–0,47	0,17 0,10–0,36	0,14 0,08–0,76	0,25 0,21–1,55	0,34 0,03–1,93
CD16/56 ⁺ CD28 ⁺ , %	0,58 0,21–1,82	0,44 0,27–1,17	0,50 0,20–2,31	0,62 0,24–0,85	0,61 0,03–6,19
CD16/56 ⁺ CD57 ⁺ , %	2,79 1,52–4,18	1,93 1,55–2,91	0,99 0,41–2,61	1,12 1,04–1,95	0,52 0,47–1,83
			p ₁ = 0,048	p ₁ = 0,048	p ₁ = 0,037 p ₂ = 0,040

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; p₄ — статистически значимые различия с показателями больных на 14 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; p₄ — statistically significant differences versus 14 days after surgery patients.

При анализе субпопуляционного состава NK-клеток обнаружено, что в дооперационном периоде у больных РГП независимо от исхода заболевания снижение NK-клеток в крови осуществляется за счет фракции зрелых клеток. Однако у больных с благоприятным исходом РГП содержание зрелых клеток восстанавливается уже к 7 суткам после операции, а на 21 сутки наблюдения значительно превышают контрольный диапазон. У пациентов с неблагоприятным исходом заболевания уровень зрелых NK-клеток в послеоперационном периоде практически не меняется. При этом их количество при неблагоприятном исходе постоянно меньше, чем при благоприятном исходе. У больных с благоприятным исходом РГП на 7 и 21 сутки послеоперационного периода в крови повышается содержание цитотоксических и цитокинпродуцирующих NK-клеток, тогда как у больных с неблагоприятным исходом заболевания повышение содержания цитотоксических NK-клеток наблюдается только на 21 сутки после операции. Более того, в дооперационном периоде и в первую неделю после операции у данной категории больных выявляется более низкий уровень цитокинпродуцирующих NK-клеток по сравнению с их количеством у пациентов с благоприятным исходом.

Способность к реализации функции NK-клетками охарактеризована через определение количества лимфоцитов, экспрессирующих активационные и адгезионные маркеры.

CD11b представляет собой α M цепь интегрина Mac-1, экспрессия данного рецептора на поверхности NK-клеток увеличивает их миграционные и эффекторные возможности [28, 31]. Так, в работе Lin W. и соавт. (2017) показано, что снижение уровня экспрессии CD11b приводило к понижению функциональной активности NK-клеток и, соответственно, к снижению интенсивности воспалительной реакции [19]. У больных с благоприятным исходом РГП количество зрелых NK-клеток с экспрессией CD11b в дооперационном периоде и в первые 2 недели послеоперационного лечения соответствует контрольному уровню и значительно повышается на 21 сутки наблюдения. Содержание цитотоксических и цитокинпродуцирующих NK-клеток, экспрессирующих CD11b, имеет 2 пика повышения: на 7 и 21 сутки послеоперационного периода. При неблагоприятном исходе РГП наблюдается снижение количества зрелых NK-клеток, экспрессирующих CD11b, в дооперационном периоде и в течение всего периода послеоперационного наблюдения. Содержание цитотоксических и цитокинпродуцирующих NK-клеток с экспрессией CD11b у лиц данной категории соответствует контрольному уровню. Однако по сравнению с количеством, выявленным при благоприятном исходе РГП, у пациентов с неблагоприятным исходом определяется пониженный уровень основных субпопуляций NK-клеток, экспрессирующих данный рецептор.

Таблица 5. Уровень экспрессии (по MFI) CD28 и CD57 на поверхности NK-клеток у больных с различными исходами РГП в динамике послеоперационного периода (Me, Q1 – Q3)

Table 5. The expression level (by MFI) of CD28 and CD57 on the surface of NK-cells in patients with different outcomes of WPP in the dynamics of the postoperative period (Me, Q1 – Q3)

Показатели Parameters	Контроль Control	Дооперационный период Preoperative period	7 сутки после операции 7 days after surgery	14 сутки после операции 14 days after surgery	21 сутки после операции 21 days after surgery
Благоприятный исход РГП/Favorable outcome of WPP					
MFI CD28⁺, о.е.	3,14 2,85–3,56	3,13 2,88–3,72	3,70 2,62–5,62	3,46 3,09–4,47	3,22 2,95–3,40
MFI CD57⁺, о.е.	29,35 13,01–44,30	30,31 19,70–50,30	25,70 14,00–67,10	30,80 23,85–44,50	20,75 12,28–36,15
Неблагоприятный исход РГП/Unfavorable outcome of WPP					
MFI CD28⁺, о.е.	3,14 2,85–3,56	4,11* 3,26–5,84	6,38* 5,85–8,62	4,80* 4,59–5,39	4,35 2,99–5,70
			$p_1 = 0,002$	$p_1 = 0,005$	
MFI CD57⁺, о.е.	29,35 13,01–44,30	32,20 30,30–48,10	75,10** 25,31–123,01	39,60 26,50–72,10	69,35** 44,90–93,80
			$p_1 = 0,015$ $p_2 = 0,041$		$p_1 = 0,045$

Примечание. p_1 — статистически значимые различия с показателями контрольной группы; p_2 — статистически значимые различия с показателями больных, находящихся в дооперационном периоде. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ — статистически значимые различия с соответствующими показателями больных с благоприятным исходом РГП.

Note. p_1 — statistically significant differences versus controls; p_2 — statistically significant differences versus patients with WPP before surgery. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ — statistically significant differences with the corresponding indexes in patients with a favorable outcome of WPP.

Молекула CD28 (Тр44) является гликопротеином, относящимся к суперсемейству иммуноглобулинов, и участвует в формировании второго активационного сигнала, что приводит к стимуляции пролиферации клеток и синтезу цитокинов [32, 36]. Обнаружено, что у больных РГП независимо от исхода заболевания количество НК-клеток, экспрессирующих CD28-рецептор, в течение всего периода наблюдения соответствует контрольным значениям. Однако при неблагоприятном исходе в дооперационном периоде и в течение 2 недель послеоперационного лечения наблюдается повышение экспрессии CD28 НК-клетками как относительно контрольных значений, так и уровней, выявляемых у пациентов с благоприятным исходом РГП.

CD57 (HNK-1, NK-1, Leu-7) представляет собой олигосахаридную антигенную детерминанту, экспрессируемую на различных белках, липидах и протеогликанах [18, 30]. Доказано, что НК-клетки, экспрессирующие рецептор CD57, способны более активно синтезировать IFN γ , но обладают сниженным уровнем пролиферации, что позволяет определить CD57⁺ НК-лимфоциты как зрелые эффекторные клетки [6, 11, 14]. Установлено, что у больных с благоприятным исходом РГП к 21 суткам послеоперационного лечения повышается количество CD57⁺ НК-клеток относительно исходного уровня. У больных с неблагоприятным исходом заболевания в послеоперационном периоде наблюдается последовательное снижение содержания НК-клеток с экспрессией CD57-рецептора относительно контрольных значений и уровней, выявленных при благоприятном исходе РГП. В то же время уровень экспрессии CD57 у данной категории в послеоперационном периоде выше, чем у здоровых людей и пациентов с благоприятным исходом заболевания.

В целом можно заключить, что при неблагоприятном исходе РГП в крови снижается количество НК-клеток с высоким уровнем миграционного и активационного потенциала.

Заключение

Таким образом, у больных РГП в зависимости от исхода заболевания обнаружены выраженные различия в фенотипе НК-клеток крови. У пациентов с благоприятным исходом РГП в дооперационном периоде снижено содержание зрелых НК-клеток. Восстановление количества НК-клеток у данной категории больных к концу послеоперационного периода (21 сутки после операции) осуществляется за счет повышения уровней зрелых, цитотоксических и цитокинпродуцирующих клеток. При благоприятном исходе заболевания к концу послеоперационного периода во всех исследуемых субпопуляциях НК-клеток крови повышается доля с экспрессией CD11b-рецептора и увеличивается количество CD57⁺ НК-клеток относительно дооперационного уровня. У больных с неблагоприятным исходом РГП в дооперационном и в течение всего послеоперационного периода выявляется снижение содержания зрелых НК-клеток, как относительно показателей здоровых людей, так и пациентов с благоприятным исходом заболевания. При неблагоприятном исходе РГП к концу наблюдаемого периода повышается уровень цитотоксических НК-клеток в крови. У данной категории больных в дооперационном периоде и после операции доля зрелых НК-клеток с экспрессией CD11b снижается. В течение всего послеоперационного периода при неблагоприятном исходе заболевания понижено содержание CD57⁺ НК-клеток, как относительно контрольного диапазона, так и количества в крови у больных с благоприятным исходом РГП. В то же время у больных с неблагоприятным исходом заболевания на НК-клетках повышается уровень экспрессии CD28 и CD57. Выявленные особенности фенотипа НК-клеток крови при неблагоприятном исходе заболевания отражают нарушения в механизмах созревания и миграции НК-клеток, что, в свою очередь, определяет расстройство процессов регулирования острой воспалительной реакции при РГП.

Список литературы/References

1. Гасанов М.Дж. Формирование алгоритмов для определения степени тяжести эндотоксикоза при перитонитах // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 2015. № 1. С. 54–57. [Gasanov M.Dzh. Formation of algorithms to determine the severity of endotoxemia in peritonitis. *Khirurgiya. Zhurnal im. N.I. Pirogova = Pirogov Russian Journal of Surgery*, 2015, no. 1, pp. 54–57. doi: 10.17116/hirurgiya2015154-57 (In Russ.)]
2. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в биомедицинских исследованиях. Екатеринбург: Уральское отделение РАН, 2018. 720 с. [Zurochka A.V., Khaidukov S.V., Kudryavtsev I.V., Chereshnev V.A. Flow cytometry in biomedical research. *Ekaterinburg: Ural Branch of the Russian Academy of Sciences*, 2018. 720 p. (In Russ.)]
3. Косинец В.А. Иммунорегулирующие свойства реамберина в комплексном лечении распространенного гнойного перитонита // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 2013. № 7. С. 29–32. [Kosinets V.A. The immunoregulating action of reamberine and its use in the treatment of diffuse peritonitis. *Khirurgiya. Zhurnal im. N.I. Pirogova = Pirogov Russian Journal of Surgery*, 2013, no. 7, pp. 29–32. (In Russ.)]
4. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шестицветного цитофлуориметрического анализа // Медицинская иммунология. 2015. Т. 17, № 1. С. 19–26. [Kudryavtsev I.V., Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, vol. 17, no. 1, pp. 19–26. doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-19-26 (In Russ.)]

5. Савченко А.А., Гвоздев И.И., Борисов А.Г., Черданцев Д.В., Первова О.В., Кудрявцев И.В., Мошев А.В. Особенности фагоцитарной активности и состояния респираторного взрыва нейтрофилов крови у больных распространенным гнойным перитонитом в динамике послеоперационного периода // *Инфекция и иммунитет*. 2017. Т. 7, № 1. С. 51–60. [Savchenko A.A., Gvozdev I.I., Borisov A.G., Cherdancev D.V., Pervova O.V., Kudryavcev I.V., Moshev A.V. Phagocytic activity and blood neutrophils respiratory burst state features amongst widespread purulent peritonitis patients in the postoperative period dynamics. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, vol. 7, no. 1, pp. 51–60. doi: 10.15789/2220-7619-2017-1-51-60 (In Russ.)]
6. Савченко А.А., Модестов А.А., Мошев А.В., Тоначева О.Г., Борисов А.Г. Цитометрический анализ NK- и NKT-клеток у больных почечноклеточным раком // *Российский иммунологический журнал*. 2014. Т. 8 (17), № 4. С. 1012–1018. [Savchenko A.A., Modestov A.A., Moshev A.V., Tonacheva O.G., Borisov A.G. Cytometric analysis of NK- and NKT-cells in patients with renal cell carcinoma. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Immunological Journal*, 2014, vol. 8 (17), no. 4, pp. 1012–1018. (In Russ.)]
7. Селькова М.С., Никитина О.Е., Селютин А.В., Михайлова В.А., Эсауленко Е.В. Особенности содержания NK-клеток у больных хроническим гепатитом С // *Медицинская иммунология*. 2012. Т. 14, № 4–5. С. 439–444. [Selkova M.S., Nikitina O.V., Mikhailova V.A., Esaulenko E.V., Seliutin A. Features of NK-cell contents in patients with chronic hepatitis C. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, vol. 14, no. 4–5, pp. 439–444. doi: 10.15789/1563-0625-2012-4-5-439-444 (In Russ.)]
8. Adib Rad H., Basirat Z., Mostafazadeh A., Faramarzi M., Bijani A., Nouri H.R., Soleimani Amiri S. Evaluation of peripheral blood NK cell subsets and cytokines in unexplained recurrent miscarriage. *J. Chin. Med. Assoc.*, 2018, vol. 81, no. 12, pp. 1065–1070. doi: 10.1016/j.jcma.2018.05.005
9. Anuforo O.U.U., Bjarnarson S.P., Jonasdottir H.S., Giera M., Hardardottir I., Freysdottir J. Natural killer cells play an essential role in resolution of antigen-induced inflammation in mice. *Mol. Immunol.*, 2018, vol. 93, pp. 1–8. doi: 10.1016/j.molimm.2017.10.019
10. Ben Mkaddem S., Aloulou M., Benhamou M., Monteiro R.C. Role of FcγRIIIA (CD16) in IVIg-mediated anti-inflammatory function. *J. Clin. Immunol.*, 2014, vol. 34, suppl. 1, S46–50. doi: 10.1007/s10875-014-0031-6
11. Björkström N.K., Riese P., Heuts F., Andersson S., Fauriat C., Ivarsson M.A., Björklund A.T., Flodström-Tullberg M., Michaëlsson J., Rottenberg M.E., Guzmán C.A., Ljunggren H.G., Malmberg K.J. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood*, 2010, vol. 116, no. 19, pp. 3853–3864. doi: 10.1182/blood-2010-04-281675
12. Chen C., Ai Q.D., Chu S.F., Zhang Z., Chen N.H. NK cells in cerebral ischemia. *Biomed. Pharmacother.*, 2019, vol. 109, pp. 547–554. doi: 10.1016/j.biopha.2018.10.103
13. Crinier A., Milpied P., Escalière B., Piperoglou C., Galluso J., Balsamo A., Spinelli L., Cervera-Marzal I., Ebbo M., Girard-Madoux M., Jaeger S., Bollon E., Hamed S., Hardwigsen J., Ugolini S., Vély F., Narni-Mancinelli E., Vivier E. High-dimensional single-cell analysis identifies organ-specific signatures and conserved NK cell subsets in humans and mice. *Immunity*, 2018, vol. 49, no. 5, pp. 971–986. doi: 10.1016/j.immuni.2018.09.009
14. Damele L., Montaldo E., Moretta L., Vitale C., Mingari M.C. Effect of tyrosin kinase inhibitors on NK cell and ILC3 development and function. *Front. Immunol.*, 2018, vol. 9, pp. 2433. doi: 10.3389/fimmu.2018.02433
15. Gardiner C.M. NK cell function and receptor diversity in the context of HCV infection. *Front. Microbiol.*, 2015, vol. 6, pp. 1061. doi: 10.3389/fmicb.2015.01061
16. Giancchetti E., Delfino D.V., Fierabracci A. NK cells in autoimmune diseases: Linking innate and adaptive immune responses. *Autoimmun. Rev.*, 2018, vol. 17, no. 2, pp. 142–154. doi: 10.1016/j.autrev.2017.11.018
17. Jabir N.R., Firoz C.K., Ahmed F., Kamal M.A., Hindawi S., Damanhoury G.A., Almehdar H.A., Tabrez S. Reduction in CD16/CD56 and CD16/CD3/CD56 natural killer cells in coronary artery disease. *Immunol. Invest.*, 2017, vol. 46, no. 5, pp. 526–535. doi: 10.1080/08820139.2017.1306866
18. Kared H., Martelli S., Ng T.P., Pender S.L., Larbi A. CD57 in human natural killer cells and T-lymphocytes. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2016, vol. 65, no. 4, pp. 441–452. doi: 10.1007/s00262-016-1803-z
19. Lin W., Man X., Li P., Song N., Yue Y., Li B., Li Y., Sun Y., Fu Q. NK cells are negatively regulated by sCD83 in experimental autoimmune uveitis. *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7, no. 1, pp. 12895. doi: 10.1038/s41598-017-13412-1
20. Mariage M., Sabbagh C., Yzet T., Dupont H., NTouba A., Regimbeau J.M. Distinguishing fecal appendicular peritonitis from purulent appendicular peritonitis. *Am. J. Emerg. Med.*, 2018, vol. 36, no. 12, pp. 2232–2235. doi: 10.1016/j.ajem.2018.04.014
21. Melsen J.E., Lugthart G., Lankester A.C., Schilham M.W. Human circulating and tissue-resident CD56(bright) natural killer cell populations. *Front. Immunol.*, 2016, vol. 7, pp. 262. doi: 10.3389/fimmu.2016.00262
22. Müller A.A., Dolowschiak T., Sellin M.E., Felmy B., Verbree C., Gadiant S., Westermann A.J., Vogel J., LeibundGut-Landmann S., Hardt W.D. An NK cell perforin response elicited via IL-18 controls mucosal inflammation kinetics during salmonella gut infection. *PLoS Pathog.*, 2016, vol. 12, no. 6: e1005723. doi: 10.1371/journal.ppat.1005723
23. Oboshi W., Watanabe T., Matsuyama Yu., Kobara A., Yukimasa N., Ueno I., Aki K., Tada T., Hosoi E. The influence of NK cell-mediated ADCC: Structure and expression of the CD16 molecule differ among FcγRIIIa-V158F genotypes in healthy Japanese subjects. *Human Immunol.*, 2016, vol. 77, iss. 2, pp. 165–171. doi: 10.1016/j.humimm.2015.11.001
24. Parodi M., Raggi F., Cangelosi D., Manzini C., Balsamo M., Blengio F., Eva A., Varesio L., Pietra G., Moretta L., Mingari M.C., Vitale M., Bosco M.C. Hypoxia modifies the transcriptome of human NK cells, modulates their immunoregulatory profile, and influences NK cell subset migration. *Front. Immunol.*, 2018, vol. 9, pp. 2358. doi: 10.3389/fimmu.2018.02358
25. Peng H., Tian Z. NK cells in liver homeostasis and viral hepatitis. *Sci. China Life Sci.* 2018, vol. 61, no. 12, pp. 1477–1485. doi: 10.1007/s11427-018-9407-2
26. Rasid O., Ciulean I.S., Fitting C., Doyen N., Cavaillon J.M. Local Microenvironment controls the compartmentalization of NK cell responses during systemic inflammation in mice. *J. Immunol.*, 2016, vol. 197, no. 6, pp. 2444–2454. doi: 10.4049/jimmunol.1601040

27. Ren Y., Hua L., Meng X., Xiao Y., Hao X., Guo S., Zhao P., Wang L., Dong B., Yu Y., Wang L. Correlation of surface toll-like receptor 9 expression with IL-17 production in neutrophils during septic peritonitis in mice induced by *E. coli*. *Mediators Inflamm.*, 2016; 3296307. doi: 10.1155/2016/3296307
28. Schmid M.C., Khan S.Q., Kaneda M.M., Pathria P., Shepard R., Louis T.L., Anand S., Woo G., Leem C., Faridi M.H., Geraghty T., Rajagopalan A., Gupta S., Ahmed M., Vazquez-Padron R.I., Cheresch D.A., Gupta V., Varner J.A. Integrin CD11b activation drives anti-tumor innate immunity. *Nat. Commun.*, 2018, vol. 9, no. 1, pp. 5379. doi: 10.1038/s41467-018-07387-4
29. Shindo Y., McDonough J.S., Chang K.C., Ramachandra M., Sasikumar P.G., Hotchkiss R.S. Anti-PD-L1 peptide improves survival in sepsis. *J. Surg. Res.*, 2017, vol. 208, pp. 33–39. doi: 10.1016/j.jss.2016.08.099
30. Solana R., Campos C., Pera A., Tarazona R. Shaping of NK cell subsets by aging. *Curr. Opin. Immunol.*, 2014, vol. 29, pp. 56–61. doi: 10.1016/j.coi.2014.04.002
31. Song P., Zhang J., Zhang Y., Shu Z., Xu P., He L., Yang C., Zhang J., Wang H., Li Y., Li Q. Hepatic recruitment of CD11b+Ly6C+ inflammatory monocytes promotes hepatic ischemia/reperfusion injury. *Int. J. Mol. Med.*, 2018, vol. 41, no. 2, pp. 935–945. doi: 10.3892/ijmm.2017.3315
32. Stojanovic A., Fiegler N., Brunner-Weinzierl M., Cerwenka A. CTLA-4 is expressed by activated mouse NK cells and inhibits NK Cell IFN- γ production in response to mature dendritic cells. *J. Immunol.*, 2014, vol. 192, no. 9, pp. 4184–4191. doi: 10.4049/jimmunol.1302091
33. Sutherland D.R., Ortiz F., Quest G., Illingworth A., Benko M., Nayyar R., Marinov I. High-sensitivity 5-, 6-, and 7-color PNH WBC assays for both Canto II and Navios platforms. *Cytometry B. Clin. Cytom.*, 2018, vol. 94, no. 1, pp. 1–15. doi: 10.1002/cyto.b.21626
34. Tahrali I., Kucuksezer U.C., Altintas A., Uygunoglu U., Akdeniz N., Aktas-Cetin E., Deniz G. Dysfunction of CD3–CD16+CD56dim and CD3–CD16–CD56bright NK cell subsets in RR-MS patients. *Clin. Immunol.*, 2018, vol. 193, pp. 88–97. doi: 10.1016/j.clim.2018.02.005
35. Tomasdottir V., Vikingsson A., Hardardottir I., Freysdottir J. Murine antigen-induced inflammation — a model for studying induction, resolution and the adaptive phase of inflammation. *J. Immunol. Methods*, 2014, vol. 415, pp. 36–45. doi: 10.1016/j.jim.2014.09.004
36. Trojan K., Zhu L., Aly M., Weimer R., Bulut N., Morath C., Opelz G., Daniel V. Association of peripheral NK cell counts with Helios(+) IFN- γ (-) T(regs) in patients with good long-term renal allograft function. *Clin. Exp. Immunol.*, 2017, vol. 188, no. 3, pp. 467–479. doi: 10.1111/cei.12945
37. Van Acker H.H., Capsomidis A., Smits E.L., Van Tendeloo V.F. CD56 in the immune system: more than a marker for cytotoxicity? *Front. Immunol.*, 2017, vol. 8, pp. 892. doi: 10.3389/fimmu.2017.00892

Авторы:

Савченко А.А., д.м.н., профессор, руководитель лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН», обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия;

Борисов А.Г., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН», обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера», 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 молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН», обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия.

Authors:

Savchenko A.A., PhD, MD (Medicine), Head of the Cellular-Molecular Physiology and Pathology Laboratory, 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;

Borisov A.G., PhD (Medicine), Leading Researcher, Cellular-Molecular Physiology and Pathology Laboratory, 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;

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, Cellular-Molecular Physiology and Pathology Laboratory, 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.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ СПРЕЯ НА ОСНОВЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКОГО ГЕНЕРАЛИЗОВАННОГО ПАРОДОНТИТА

Н.Г. Саркисян^{1,2}, Н.Н. Катаева¹, И.А. Тузанкина², С.Г. Меликян¹, В.А. Зурочка^{2,3},
А.В. Зурочка^{2,3}

¹ ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Екатеринбург, Россия

² Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия

³ ФГАОУ ВО Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет), г. Челябинск, Россия

Резюме. Традиционно в лечении заболеваний пародонта используют антибактериальные препараты. Однако с ростом устойчивости к большинству этих препаратов появилась необходимость в разработке новых подходов к лечению заболеваний полости рта. На сегодняшний день в стоматологии наиболее актуальным направлением является создание антибактериальных лекарственных средств на основе природных, полусинтетических и синтетических пептидов, которые могут выступать альтернативой антибактериальным препаратам. Одним из таких средств, содержащих в качестве основного действующего вещества синтетический пептид (ZP2) активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ), является «Ацеграм-спрей» (производство ООО «Академический инновационный научный центр», г. Челябинск). Цель исследования: оценить эффективность комплексного лечения воспалительных заболеваний пародонта с помощью «Ацеграм-спрея»; показать взаимосвязь биологических свойств пептида ZP2, физико-химических свойств спрея на его основе с механизмом антибактериального и иммуностропного действия в рамках обоснования его применения на слизистой полости рта. Результаты первого этапа исследования показали, что пептид ZP2 обладает способностью вызывать бластную трансформацию лимфоцитов *in vitro*. Это свидетельствует о возможности его влияния на процессы пролиферации клеток и о его выраженной иммуностропной активности. Следующим этапом исследований была оценка влияния синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ на формирование биопленок клиническими изолятами стафилококков. Пептид ZP2 угнетал формирование биопленок у 75,0±9,0% штаммов *S. aureus* и 50,0±15,1% штаммов *S. epidermidis* со средним уровнем ингибирования формирования биопленок на 25,1±3,8 и 50,4±6,0% соответственно. Вместе с тем среди клинических изолятов стафилококков встречалось 8,3–25,0% штаммов, у которых под действием пептида в данной концентрации наблюдалась стимуляция образования биопленок на 14,9–48,5%, а также 16,7–25,0% культур, у которых формирование биопленок не изменялось. Таким образом, пептид ZP2 оказывает на формирование биопленок клиническими штаммами стафилококков разнонаправленное, но преимущественно ингибирующее действие, выраженность которого характеризуется меж- и внутривидовой (штаммовой) вариабельностью. Применение спрея на основе синтетического пептида в ходе антибактериальной терапии при лечении хронического генерализованного пародонтита легкой степени тяжести у пациентов основной груп-

Адрес для переписки:

Саркисян Нарине Гришаевна
620028, Россия, г. Екатеринбург, Репина, 3, ФГБОУ ВО
Уральский государственный медицинский университет МЗ РФ.
Тел./факс: 8 (343) 214-86-52.
E-mail: narine_25@mail.ru

Contacts:

Narine G. Sarkisian
620028, Russian Federation, Yekaterinburg, Repin str., 3,
Ural State Medical University.
Phone/Fax: +7 (343) 214-86-52.
E-mail: narine_25@mail.ru

Библиографическое описание:

Саркисян Н.Г., Катаева Н.Н., Тузанкина И.А., Меликян С.Г., Зурочка В.А.,
Зурочка А.В. Оценка эффективности спрея на основе синтетического
пептида в комплексном лечении хронического генерализованного
пародонтита // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 3–4. С. 549–558.
doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-549-558

Citation:

Sarkisian N.G., Kataeva N.N., Tuzankina I.A., Melikyan S.G., Zurochka V.A.,
Zurochka A.V. Assessing efficiency of synthetic peptide-containing spray
in combination therapy of chronic generalized periodontitis // Russian
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9,
no. 3–4, pp. 549–558. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-549-558

пы исследования выявило улучшение гигиенического состояния полости рта на 28,5%, снижение индекса РМА на 82,8%, уменьшение индекса кровоточивости десны на 100% через месяц после лечения. У пациентов группы сравнения, проходивших стандартное лечение, аналогичные показатели оценки состояния тканей пародонта были количественно ниже в среднем в 2 раза. В результате анализа физико-химических свойств спрея, таких как водородный показатель, буферная емкость и осмотическое давление раствора была показана их взаимосвязь с механизмом антибактериального действия препарата и эффективностью применения препарата при лечении воспалительных заболеваний пародонта. Таким образом, оценка биологических свойств пептида и физико-химических показателей средства на его основе позволяет определить их роль в механизме антибактериального и иммуностропного действия, ранее не описанную. Данные выводы подтверждают целесообразность и эффективность применения «Ацеграм-спрея» в стоматологии в качестве альтернативы противомикробным средствам, таким как антибактериальные препараты.

Ключевые слова: заболевание пародонта, синтетический пептид, иммуностропная активность, физико-химические свойства, антибактериальное действие.

ASSESSING EFFICIENCY OF SYNTHETIC PEPTIDE-CONTAINING SPRAY IN COMBINATION THERAPY OF CHRONIC GENERALIZED PERIODONTITIS

Sarkisian N.G.^{a,b}, Kataeva N.N.^a, Tuzankina I.A.^b, Melikyan S.G.^a, Zurochka V.A.^{b,c}, Zurochka A.V.^{b,c}

^a Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Yekaterinburg, Russian Federation

^b Institute of Immunology and Physiology Ural detachment of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

^c South Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Antibacterial drugs are routinely used in therapy of periodontal diseases. However, increasing incidence of antibiotics resistance necessitates development of novel therapeutic approaches for oral diseases. Currently, newly designed antibacterial agents based on natural, semi-synthetic and synthetic peptides is the most promising approach in dentistry. Among them is a product containing synthetic peptide (ZP2) replicating active site of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) as the main active ingredient in Atsegram-spray (manufactured by Academic Innovation Research Center, Chelyabinsk). Our study was aimed at assessing efficacy of a combination therapy of inflammatory periodontal diseases by introducing Atsegram-spray as well as examining potential relationship between peptide ZP2-related biological properties, physicochemical properties of the spray and mechanism of antibacterial and immunotropic action for substantiating its application on oral mucosa. During the first stage experiments, it was found that the peptide ZP2 was able to trigger lymphocyte blast transformation in vitro indicating that it might influence cell proliferation and exhibit marked immunotropic activity. Next, we assessed potential effects of the peptide ZP2 on biofilm formation mediated by staphylococcal clinical isolates. It was shown that peptide ZP2 inhibited biofilm formation in 75.0±9.0% of *S. aureus* and 50.0±15.1% of *S. epidermidis* strains, with mean inhibition index of biofilm formation reaching 25.1±3.8 and 50.4±6.0%, respectively. However, peptide ZP2 in 8.3–25.0% of staphylococcal clinical isolates was found to stimulate/lack effect on biofilm formation by 14.9–48.5 and 16.7–25.0% cultures, respectively. Thus, the synthetic peptide ZP2 exerts divergent, but mainly inhibitory effects on biofilm formation with staphylococcal clinical strains, which are characterized by inter- and intraspecific (strain) variability. Use of a synthetic peptide-based spray in antibacterial therapy of mild chronic generalized periodontitis (main group) one month after the onset was found to improve oral hygiene by 28.5% as well as decrease PMA index and gum bleeding index by 82.8 and 100%, respectively. In contrast, such parameters in patients receiving basic therapy (comparison group) were lower on average by 2-fold. While analyzing physicochemical properties of the spray such as pH, buffer capacity and solution osmotic pressure, it was found that they were related to the antibacterial mechanism of drug activity and efficacy in treatment of inflammatory periodontal diseases. Thus, assessing peptide ZP2-related biological properties and physicochemical parameters of the spray allows to evaluate their role in mechanism of previously unknown antibacterial and immunotropic activity. These findings confirm feasibility and efficacy of using Atsegram-spray in dentistry as an alternative means to antimicrobial agents, such as antibacterial drugs.

Key words: periodontal disease, synthetic peptide, immunotropic activity, physical and chemical properties, antibacterial effect.

Введение

В слюне здорового человека находится достаточное количество пептидов, обеспечивающих поддержание генетического постоянства внутренней среды. Помимо того, пептиды участвуют в защите тканей полости рта от внедрения патогенов, а также от механических, темпера-

турных и химических воздействий. Несмотря на это, по данным ВОЗ, одно из ведущих мест среди заболеваний организма занимают болезни полости рта, вызванные чрезмерным ростом микроорганизмов [18]. К таким заболеваниям можно отнести пародонтит. Согласно результату II национального эпидемиологического обследования населения, здоровый пародонт встре-

чается лишь у 10% населения России. Выявлено, что воспалительные процессы начального характера встречаются у 54% населения, тогда как проявления средней и тяжелой степени наблюдаются у 24 и 14% соответственно [17].

Лечение воспалительных процессов в тканях пародонта требует комплексного подхода, так как представляет собой многогранную проблему. В настоящее время ведутся поиски наиболее эффективных методов этиопатогенетического лечения, направленных на обеспечение клинической ремиссии заболеваний пародонта [15].

Традиционно, в лечении заболеваний пародонта используются антибактериальные препараты. Однако с ростом устойчивости к этим лекарственным средствам появилась необходимость в разработке новых подходов к лечению заболеваний полости рта. На сегодняшний день в стоматологии наиболее актуальным направлением является создание антибактериальных средств на основе природных, полусинтетических и синтетических пептидов, которые могут выступать альтернативой антибиотикам [10].

Одним из таких препаратов, содержащих в качестве основного действующего вещества синтетический пептид (ZP2) активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ), является «Ацеграм-спрей» (производство ООО «Академический инновационный научный центр», г. Челябинск) [6]. Изучение биологических свойств пептида ZP2, в рамках ранее проведенного исследования выявило, что он обладает антибактериальной активностью в отношении как грамположительной, так и грамотрицательной флоры [6]. Представляет интерес детальное изучение иммуностропных свойств пептида, а также исследование ряда физико-химических свойств спрея на его основе, которые позволяют описать механизм действия препарата, в том числе в процессе его применения на слизистой полости рта.

Цель исследования: оценить эффективность комплексного лечения воспалительных заболеваний пародонта с помощью «Ацеграм-спрея», содержащего в качестве активного вещества синтетический пептид; показать взаимосвязь биологических свойств пептида, физико-химических свойств спрея на его основе с механизмом антибактериального и иммуностропного действия в рамках обоснования его применения на слизистой полости рта.

Материалы и методы

Объект исследования: синтетический пептид ZP2 (химическая формула — THR-NLE-NLE-ALA-SER-HIS-TYR-LYS-GLN-HIS-CYS-PRO) активного центра ГМ-КСФ в составе

косметического средства «Ацеграм-спрей», сертификат соответствия РОСС RU.AB66.H00566 (№ 0203563), ТУ 20.42.15-001-686817-50-2017. По протоколу лабораторных исследований № 25556.07.04 от 24.10.2017 г. средство не содержит токсических примесей, не обладает токсическими свойствами, не обладает кожно-раздражающим действием. Препарат способствует восстановлению слизистой оболочки полости рта после проведения стоматологических оперативных вмешательств, рекомендован при антибактериальной терапии заболеваний пародонта, для лечения стоматитов и гингивитов. Средство объемом 100 мл содержит 200 мкг синтетического пептида ZP2, изотонический раствор NaCl 0,9% 100 мл, стабилизатор Benzyltrimethylammonium chloride 0,1% раствор на 100 мл препарата. По данным авторов стабилизатор в данной концентрации не оказывал дополнительного антибактериального эффекта в отношении грамотрицательных бактерий [6, 7, 8].

Для характеристики иммуностропных эффектов синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ была дана экспериментальная оценка его влияния на пролиферативную активность лимфоцитов в реакции бластной трансформации лимфоцитов (РБТЛ), которую оценивали методом проточной цитометрии [13]. Пролиферативное действие синтетического пептида ZP2 изучали в концентрации 10 мкг/мл. В качестве контроля был использован ФГА (Дифко, США) в стандартной концентрации для РБТЛ (1 и 10 мкг/мл) и интерлейкин 2 (IL-2) в концентрации 10 мкг/мл.

Оценку влияния пептида ZP2 на биообразование бактерий проводили в опыте *in vitro* на 36 клинических штаммах стафилококков из коллекции ИКВС УрО РАН, в том числе на 24 культурах *Staphylococcus aureus* и 12 изолятах *S. epidermidis*, выделенных из ран у больных с синдромом диабетической стопы и отделяемого из влагалища у женщин с субмукозной миомой матки. Видовую идентификацию клинических изолятов стафилококков проводили общепринятыми методами, в том числе по биохимическим признакам с использованием официальных тест-систем «Staphy Test» (Lachema, Чехия).

Исследование влияния синтетического пептида ZP2 на биообразование (БПО) клинических штаммов стафилококков осуществляли с помощью «планшетного метода» [19] с незначительными модификациями по протоколу Stepanovic S. [26], путем их выращивания в стерильном 96-луночном полистироловом планшете. Для этого в микроячейки с 225 мкл мясопептонного бульона (МПБ) без синтетического пептида ZP2 (контроль) и с его наличием в кон-

центрации 10 мкг/мл (опыт) вносили 25 мкл взвесей микроорганизмов, приготовленных из суточных агаровых культур бактерий и содержащих 5×10^8 КОЕ/мл. После инкубирования планшетов в течение 24 ч при 37°C из лунок удаляли планктонные клетки, отсасывая микропипеткой надосадок; образовавшиеся на дне микрочаек биопленки трехкратно отмывали 300 мкл стерильного фосфатно-солевого буфера (рН = 7,2), фиксировали (подсушивание при 37°C в течение 2 ч) и окрашивали их 2% раствором кристаллвиолета (150 мкл; 15 мин при комнатной температуре), после чего лунки трех- или четырехкратно промывали дистиллированной водой (до ее полного просветления); для экстракции красителя из биопленок в лунки вносили по 200 мкл смеси этанола и уксусной кислоты (95:5), выдерживали 30 мин, а затем 150 мкл надосадка отсасывали и переносили в чистый планшет для замера оптической плотности (OD) при длине волны 540 нм с помощью планшетного фотометра Multiscan Ascent (Thermo Electron Co., Китай). Интенсивность окрашивания надосадка, рассчитываемая путем вычитания из OD (биопленка) OD отрицательного контроля (лунка с МПБ без культуры бактерий), соответствовала степени биопленкообразования (БПО, усл. ед.) исследуемых культур стафилококков. Эксперименты делали в трех повторностях, вычисляли средние значения БПО.

Изучение физико-химических свойств «Ацеграм-спрея» проводилось на базе кафедры общей химии Уральского государственного медицинского университета, г. Екатеринбург. Для водных растворов «Ацеграм-спрея» определяли следующие физико-химические показатели: водородный показатель (рН), буферную емкость по кислоте и по основанию (Вк, Во, ммоль \times экв/л), осмомоляльность (ммоль/1кг H₂O) и осмотическое давление (кПа). Измерение водородного показателя и буферной емкости осуществляли потенциометрически на рН-метре со стеклянным электродом «рН-150МИ» (ООО «Измерительная техника», Москва). Для установления буферной емкости готовили водный раствор с объемной долей по препарату 10%. Осмомоляльность определяли с помощью осмометра криоскопического медицинского «ОСКР-1М» («КИВИ осмометрия», Санкт-Петербург). Осмотическое давление рассчитывали на основе закона Вант-Гоффа.

В клинической части исследования приняло участие 10 человек в возрасте 26–39 лет, которые относятся ко II группе здоровья (ВОЗ) с диагнозом «К 05.31. Хронический генерализованный пародонтит (МКБ 10) легкой степени тяжести в стадии обострения». Диагноз установлен на основании клинических и рентгенологических методов обследования, которые проводи-

ли в стоматологической клинике «Дента ОС» г. Екатеринбурга. Клиническое обследование всех пациентов включало в себя опрос, осмотр полости рта, определение состояния твердых тканей зубов и пародонта. Была проведена индексная оценка гигиенического состояния по методике Грина–Вермильона. Состояние тканей пародонта определяли с помощью индекса РМА в модификации Parma, индекса кровоточивости десневого края (Мюллемана).

В контрольной группе (5 пациентов) лечение включало профессиональную гигиену полости рта, а также введение в пародонтальные карманы антисептического раствора хлоргексидина биглюконата 0,1%, повязки на десну с гелем противомикробного действия «Метрогил-дента». Кратность процедуры: 2 раза в сутки в течение 7 дней. В основной группе (5 пациентов) в комплексном лечении была проведена профессиональная гигиена полости рта, а также назначен «Ацеграм-спрей», который вводили в пародонтальные карманы, предварительно обработанные водой для инъекций, по 0,3 мл 1 раз в день курсом 7 дней. Оценку клинических признаков выраженности воспалительного процесса осуществляли до лечения и через один месяц после лечения. Данные были обработаны методами вариационной статистики [12, 16].

Результаты и обсуждение

На первом этапе изучалось влияние пептида ZP2, входящего в состав «Ацеграм-спрея», на РБТЛ. Результаты эксперимента представлены в таблице 1.

Как показали исследования, пептид ZP2 обладает способностью вызывать бластную трансформацию лимфоцитов *in vitro*. Это свидетельствует о возможности его влияния на процессы пролиферации клеток и о его выраженной иммуностропной активности. При этом надо отметить, что пептид обладал значительно более высокой активностью по сравнению со стандартным митогеном ФГА и IL-2.

Следующим этапом исследований была оценка влияния синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ на формирование биопленок клиническими изолятами стафилококков.

Золотистые и коагулазоотрицательные стафилококки занимают лидирующие позиции в структуре возбудителей таких эндогенных бактериальных инфекционно-воспалительных заболеваний, как пародонтит, послеоперационные (нозокомиальные) инфекционные осложнения [5]. При развитии инфекционно-воспалительного процесса в него неминуемо вовлекаются клетки иммунной системы, синтезирующие различные цитокины, выполняющие регуляторную функцию [11].

Одним из таких цитокинов является ГМ-КСФ [22], синтетический аналог активного центра которого, в частности пептид ZP2, проявляет плеiotропные эффекты, обладая, помимо функции стимуляции костномозгового кроветворения, иммуномодулирующей активностью (как показано выше). Кроме того, в серии экспериментальных работ на эталонных (музейных) и клинических штаммах микроорганизмов, в том числе стафилококков, установлено, что синтетический пептид ZP2 оказывает ингибирующее действие на развитие бактериальных популяций в жидкой питательной среде, характер и выраженность которого зависит от таксономической принадлежности стафилококков. В то же время влияние синтетического пептида ZP2 на качественные (биологические, патогенные, персистентные) свойства микроорганизмов пока не было охарактеризовано, что послужило побудительным мотивом для проведения настоящего исследования. В качестве «биомишени» была выбрана способность микроорганизмов формировать биопленки, поскольку данное свойство относится к факторам персистенции и адаптации бактерий, в том числе стафилококков [2, 19, 25].

С этой целью провели оценку влияния пептида ZP2 на формирование биопленок клиническими изолятами стафилококков разных видов в экспериментах *in vitro*.

Сравнительный анализ средних значений степени биоопленкообразования (БПО) клинических изолятов *S. aureus* (n = 24) и *S. epidermidis* (n = 12) выявил, что золотистые стафилококки по этому показателю значительно (в 2 раза) уступали эпидермальным стафилококкам ($0,44 \pm 0,04$ против $0,87 \pm 0,14$ усл. ед.; $p > 0,01$). Это отражает межвидовые отличия золотистых и коагулазоотрицательных стафилококков по способности формировать биопленки, на что ранее указывали другие авторы [20, 21, 25].

В то же время следует отметить наличие выраженной внутривидовой вариабельности данного признака, о чем свидетельствовали широкие диапазоны варьирования БПО у клинических изолятов *S. aureus* и *S. epidermidis* (соответственно $0,20 \dots 0,93$ и $0,31 \dots 2,06$ усл. ед.).

Оценивая влияние синтетического пептида ZP2 на формирование биопленок клиническими штаммами *S. aureus* и *S. epidermidis*, можно констатировать, что независимо от родовой принадлежности стафилококков под действием данного пептида у изученных бактерий наблюдалось ингибирование способности к БПО: в среднем на 22,2% — для золотистого стафилококка (с $0,44 \pm 0,04$ до $0,36 \pm 0,04$ усл. ед.) и на 33,8% — для эпидермального стафилококка (с $0,87 \pm 0,14$ до $0,65 \pm 0,10$ усл. ед.).

Таблица 1. Исследование влияния пептидов активного центра ГМ-КСФ на РБТЛ

Table 1. Study of the effect of GM-CSF active center peptides on RBTL

№	Вещество Substance	Содержание бластных клеток, % Content blast cells, %
1	Спонтанный уровень Spontaneous level	11,65–1,3
2	ФГА — 1 мкг/мл PHA — 1 µg / m	26,2–1,7
3	ФГА — 10 мкг/мл PHA — 10 µg / m	62,85–2,8*
4	IL-2 — 10 мкг/мл IL-2 — 10 µg/ml	72,46–3,24*
5	ZP2 — 10 мкг/мл ZP2 — 10 µg/ml	97,35–5,4*,**

Примечание. * $p < 0,05$ по отношению к спонтанному уровню реакции бластной трансформации лимфоцитов (РБТЛ); ** $p < 0,05$ по отношению к интерлейкину 2 (IL-2) и фитогемагглютинуину (ФГА). ZP2 — синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ.

Note. * $p < 0.05$ in relation to the spontaneous level of the reaction of blast transformation of lymphocytes (RBTL); ** $p < 0.05$ with respect to interleukin 2 (IL-2) and phytohemagglutinin (PHA). ZP2 is a synthetic peptide of the active site of GM-CSF.

Вместе с тем при детальном анализе влияния синтетического пептида ZP2 на биоопленкообразование отдельными штаммами стафилококков (в парах контроль—опыт) было отмечено, что данный пептид оказывал разнонаправленное действие на способность формировать биопленки как клиническими изолятами *S. aureus*, так и культурами *S. epidermidis*.

Таким образом, в структуре клинических штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis*, кроме изолятов стафилококков, у которых выявлялся ингибирующий эффект синтетического пептида ZP2 на БПО, имелись культуры бактерий (16,7 и 25,0% соответственно) с индифферентной реакцией на него, а также определенная доля штаммов золотистых и эпидермальных стафилококков, у которых под действием данного пептида происходила стимуляция способности к формированию биопленок (8,3 и 25,0% соответственно).

Эти результаты свидетельствовали о выраженной внутривидовой вариабельности стафилококков разных родов не только по способности к формированию биопленок, но и по реакции на действие синтетического пептида ZP2, что может быть связано с наличием в изученных выборках разных клоновых линий стафилококков, у которых генетическая детерминация БПО может иметь существенные отличия.

Более подробная информация о влиянии синтетического пептида ZP2 на БПО клиническими штаммами *S. aureus* и *S. epidermidis* представлена в таблице 2.

Как видно из таблицы 2, синтетический пептид ZP2 угнетал формирование биопленок у 75,0±9,0% штаммов *S. aureus* и 50,0±15,1% штаммов *S. epidermidis* со средним уровнем ингибирования формирования биопленок на 25,1±3,8 и 50,4±6,0% соответственно. Вместе с тем среди клинических изолятов стафилококков встречалось 8,3–25,0% штаммов, у которых под действием пептида в данной концентрации наблюдалась стимуляция образования биопленок на 14,9–48,5%, а также 16,7–25,0% культур, у которых формирование биопленок не изменялось.

Таким образом, синтетический пептид ZP2 оказывает на формирование биопленок клиническими штаммами стафилококков разнонаправленное, но преимущественно ингибирующее действие, выраженность которого характеризуется меж- и внутривидовой (штаммовой) вариабельностью.

В итоге, несмотря на выявленную меж- и внутривидовую вариабельность чувствительности стафилококков к антибактериальному действию синтетического пептида ZP2, рост в жидкой питательной среде большинства клинических изолятов данных микроорганизмов существенно ингибировался указанным пептидом, что определяет перспективность его использования при лечении инфекционно-воспалительных заболеваний стафилококковой этиологии, в том числе эндогенной природы [4]. Поскольку известно, что регуляторные пути для формирования биопленок различаются

между клоновыми линиями — СС1-СС8 стафилококков [24], возник вопрос, можно ли выявленные нами различия объяснить этой причиной. Для развития биопленки у золотистого стафилококка в норме в генетическом локусе необходим стафилококковый регулятор (*sarA*), который контролирует внутриклеточный адгезин (*ica*-оперон) и *agr*-регулируемые пути [23]. Было высказано предположение, что образование биопленок метициллин-устойчивыми вариантами *S. aureus* (MRSA) преимущественно находится под регулирующим контролем клеточной *agr*-системы и сопряжено с поверхностными адгезинами, тогда как у метициллин-чувствительных культур *S. aureus* (MSSA) выраженность данного свойства больше зависит от работы *icaADBC* оперона, имеющего отношение к межклеточной адгезии (типа cell to cell) и синтезу полисахаридного межклеточного адгезина (polysaccharide intercellular adhesin — PIA), также называемому поли-N-ацетилглюкозамин (PNAG) или слизию [23]. Однако четкая роль *ica* локуса у золотистого стафилококка не так очевидна, как у эпидермального стафилококка [20]. При этом надо принять во внимание ранее проведенные нами исследования о том, что синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ снижает рост и размножение данных клинических изолятов стафилококков [9].

Таким образом, результаты изучения биологических свойств свидетельствуют о том, что синтетический пептид активного центра

Таблица 2. Влияние синтетического пептида ZP2 на биопленкообразование (БПО) клиническими штаммами стафилококков

Table 2. Effect of synthetic peptide ZP2 on biofilm formation (BPO) by clinical strains of staphylococci

Параметры биопленкообразования (БПО) бактерий Characteristic biofilm (BPO) bacteria's	Значения параметров у разных видов стафилококков Parameter values of different types of <i>Staphylococcus</i>	
	<i>S. aureus</i> (n = 24)	<i>S. epidermidis</i> (n = 12)
Количество штаммов бактерий, у которых ZP2 ингибировал БПО, абс. (%) The number of strains of bacteria which inhibited ZP2 PCM, abs. (%)	18 (75,0±9,0)	6 (50,0±15,1)
Диапазон ингибирования БПО (min-max, %) BPO inhibition range (min-max, %)	6,6–24,4	31,7–69,8
Средние значения уровня ингибирования БПО (%) The average rate of inhibition of BPO (%)	25,1±3,8	50,4±6,0*
Количество штаммов бактерий, у которых ZP2 не изменял БПО, абс. (%) The number of strains of bacteria in which ZP2 did not change BPO, abs. (%)	4 (16,7±7,8)	3 (25,0±13,1)
Количество штаммов бактерий, у которых ZP2 стимулировал БПО, абс. (%) The number of strains of bacteria in which ZP2 stimulated BPO, abs. (%)	2 (8,3±5,8)	3 (25,0±13,1)
Диапазон стимуляции БПО (min-max, %) The range of stimulation BPO (min-max, %)	18,1–21,6	28,6–48,5
Средние значения уровня стимуляции БПО (%) The average rate of stimulation of BPO (%)	19,9±1,8	39,8±5,9*

Примечание. * Достоверность отличий между группами, $p < 0,05$. ZP2 — синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ.
Note. * Reliability of differences between groups, $p < 0.05$. ZP2 is a synthetic peptide of the active site of GM-CSF.

ГМ-КСФ обладает антибактериальной и иммуностимулирующей активностью, в том числе снижает биопленкообразование у большинства золотистых стафилококков (75%) и, частично (50%), у эпидермальных стафилококков, что должно положительно сказаться при терапии гнойно-воспалительных заболеваний, в том числе и ротовой полости, и, в частности, пародонта. Нужно учесть, что пептид имеет не один механизм воздействия на бактерии, так как в различных концентрациях подавляет рост и размножение стафилококков [9]. Значимость вклада грамположительных стафилококков, как и других видов бактерий в формирование воспалительных заболеваний десен, конечно же, требует дополнительных исследований. Но, учитывая широкий спектр антибактериального действия косметического средства «Ацеграм-спрей» в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий [6, 7, 8, 9], оно может быть использовано в качестве антисептического средства в стоматологической практике. Полученные данные являются предпосылкой для того, чтобы оценить эффективность применения препарата на основе пептида активного центра ГМ-КСФ в комбинированной терапии как дополнение к стандартным протоколам ведения больных с воспалительными заболеваниями десен.

При изучении стоматологического статуса пациентов после завершения базисной терапии (группа сравнения) отмечался положительный клинический эффект. Это проявилось в уменьшение гиперемии и отека слизистой оболочки десны, снижение кровоточивости десен, хотя усеченные вершины десневых сосочков сохраняли цианотичный оттенок. Гигиеническое

состояние полости рта улучшилось на 42,1%, в группе сравнения индекс гигиены остался «удовлетворительным», индекс РМА снизился на 66,6%, ИК уменьшился на 71,4%.

У больных, которым «Ацеграм-спрей» вводился в пародонтальные карманы (основная группа), отмечена более заметная положительная динамика: слизистая оболочка становилась бледно-розовой, ее отек и кровоточивость практически отсутствовали. Это подтверждалось и оценкой состояния тканей пародонта (ОНИ-S, РМА, РВИ). Наблюдалось снижение показателей в среднем в 2 раза по отношению к группе сравнения (табл. 3). При этом гигиеническое состояние полости рта улучшилось на 67,3%, в основной группе до лечения был «плохим», стал «хорошим»; значение индекса РМА снизилось на 82,8%, а значение индекса кровоточивости достигло 0, что говорит об отсутствии выраженных воспалительных явлений в тканях пародонта.

В ходе изучения физико-химических свойств, в частности потенциометрического измерения, были определены водородные показатели непосредственно «Ацеграм-спрея» (рН = 6,56) и разбавленного водного раствора данного препарата с $\phi = 10\%$ (рН = 6,54). При разбавлении водой произошло незначительное уменьшение рН, так как водородный показатель дистиллированной воды, использованной в ходе приготовления раствора, составлял 5,56. Водородный показатель препарата близок к интервалу значений рН смешанной слюны, который в норме у взрослых людей составляет 6,8–7,4 [3], что предотвращает дискомфортные ощущения, например, чувство жжения при контакте препарата со слизистой оболочкой полости рта. При разбавлении водой происходит небольшое уменьшение рН,

Таблица 3. Динамика значений индексов состояния полости рта и тканей пародонта у больных хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести

Table 3. Dynamics of values of indices of the oral cavity and periodontal tissues in patients with chronic generalized periodontitis of mild severity

Индексы Indexes	До лечения Before treatment		Через месяц после лечения One month after treatment	
	Группа сравнения Group comparisons n = 5	Основная группа Major group n = 5	Группа сравнения Group comparisons n = 5	Основная группа Major group n = 5
Индекс гигиены Грина–Вермиллиона (ОНИ-S) Green–Vermillion hygiene index	1,9±0,2	2,1±0,2	1,1±0,1	0,3±0,3*
Папиллярно-маргинально-альвеолярный индекс (РМА Parma, %) Papillary-marginal-alveolar index	24±0,21	28±0,12	8,0±0,14	0,8±0,13
Индекс кровоточивости (РВИ Muhlemann) Bleeding index	0,7±0,2	0,9±0,1	0,2±0,1	0*

Примечание. *Показатель достоверно отличался от показателя в группе сравнения, $p < 0,5$.

Note. *Reliability of differences between groups, $p < 0.5$.

что свидетельствует о буферных свойствах препарата, способного поддерживать постоянное значение водородного показателя при десятикратном разбавлении.

Количественной характеристикой, подтверждающей буферные свойства системы, является буферная емкость [15]. В ходе исследования были измерены величины рН 10%-го раствора препарата после добавления минеральной кислоты и щелочи, полученные результаты использовались для расчета буферной емкости по кислоте (V_k) и буферной емкости по основанию (V_o). Величины буферной емкости $V_k = 7,5 \times 10^{-2}$ ммоль \times экв/л, $V_o = 3 \times 10^{-2}$ ммоль \times экв/л свидетельствуют о том, препарат обладает относительно невысокими буферными свойствами. При разбавлении буферного раствора величина буферной емкости уменьшается вследствие снижения концентрации всех компонентов раствора [15], поэтому буферная емкость 100% препарата будет на порядок выше, чем у 10% раствора. Буферная емкость исследуемого средства по кислоте в 2,5 раза превышает буферную емкость по основанию. Данную разницу величин V_k и V_o можно объяснить особенностями химического строения главного компонента препарата — синтетического пептида ZP2, в составе которого преобладают основные группы таких аминокислот, как лизин и гистидин. Основной характер пептида, и, как следствие, более высокая буферная емкость по кислоте, оправдан целевым назначением спрея. Такие заболевания, как стоматит, гингивит, фарингит, приводят к ацидозу слюны, поскольку патогенные микроорганизмы, например, грибы рода *Candida*, стафилококки, стрептококки активно синтезируют молочную и другие органические кислоты [3]. Для восстановления кислотно-основного равновесия в ротовой полости кислые продукты метаболизма грибков, бактерий и вирусов должны быть нейтрализованы основанием, роль которого выполняет пептид «Ацеграм-спрей».

При растворении в воде основные пептиды приобретают положительный заряд, что повышает их растворимость. Известно, что катионы легко адсорбируются на клеточных стенках бактерий, содержащих отрицательно заряженные фосфатные и карбоксильные группы. Это вызывает изменение осмотического равновесия и нарушение целостности бактериальной мембраны [1]. В ходе исследования криоскопическим методом была определена осмоляльность «Ацеграм-спрея» (296 ммоль/кг H_2O) и посчитано осмотическое давление (~806 кПа при $T = 310$ К). По отношению к бактериям, внутриклеточное давление которых варьируется в пределах 400–3000 кПа [1], водный 100% раствор препарата может быть гипо- или гипертоническим.

В литературных источниках есть информация о том, что наиболее распространенные бактерии ротовой полости — стафилококки и стрептококки — устойчивы в гипертонических растворах хлорида натрия [3], поэтому можно предположить, что «Ацеграм-спрей» гипотоничен по отношению к ним и вызывает лизис бактериальных клеток.

Сравнивая величины осмоляльностей смешанной слюны взрослого человека (50–110 ммоль/кг H_2O) и «Ацеграм-спрея» (296 ммоль/кг H_2O), можно сделать вывод о гипертонических свойствах препарата по отношению к клеткам слизистой ротовой полости. Следовательно, спрей способствует уменьшению отека тканей слизистой при воспалении за счет плазмолиза клеток (то есть оттока воды из клеток наружу).

Таким образом, в ходе работы была выявлена взаимосвязь биологических свойств пептида ZP2, физико-химических свойств «Ацеграм-спрея» с механизмом антибактериального и иммуностропного действия препарата, что подтверждает возможность применения данного средства при лечении хронического генерализованного пародонтита.

Заключение

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что средство «Ацеграм-спрей», основу которого составляет синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ, позволяет улучшить клиническую картину и индексные показатели, повысить эффективность стандартной терапии воспалительных заболеваний пародонта, также выбрать наиболее оптимальную методику применения спрея у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом в стадии обострения.

Анализ биологических свойств индивидуального пептида и физико-химических показателей средства на его основе показывает их роль в механизме антибактериального и иммуностропного действия, ранее не описанную.

Полученные данные позволяют предположить, что применение «Ацеграм-спрея» в комплексном лечении у пациентов с хроническим пародонтитом дает положительный эффект, что определяет необходимость дальнейшего развития представленной работы.

Работа выполнена в рамках Комплексной программы фундаментальных исследований УрО РАН «Расшифровка механизмов иммунологической регуляции физиологических функций, разработка на их основе клеточных технологий и отбор кандидатов для новых лекарственных препаратов для лечения социально значимых заболеваний» (№ Гос. регистрации АААА-А18-118020590109-4).

Список литературы/References

1. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология. Учебник для вузов. М.: Медицинское информационное агентство, 2005. 734 с. [Borisov L.B. Medical microbiology, virology, immunology. Textbook for high schools. Moscow: Medicinskoe informacionnoe agentstvo, 2005. 734 p. (In Russ.)]
2. Бухарин О.В. Инфекционная симбиология // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2015. № 4. С. 4–9. [Bukharin O.V. Infectious symbiology. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2015, no. 4, pp. 4–9. (In Russ.)]
3. Вавилова Т.П., Янушевич О.О., Островская И.Г. Слюна. Аналитические возможности и перспективы. М.: Бино, 2014. 312 с. [Vavilova T.P., Yanushevich O.O., Ostrovskaya I.G. Saliva. Analytical opportunities and prospects. Moscow: Binom, 2014. 312 p. (In Russ.)]
4. Гриценко В.А., Аминин Д.Л., Зурочка А.В., Зурочка В.А., Иванов Ю.Б. Некоторые биологические эффекты иммуномодуляторов естественного и синтетического происхождения in vitro как основа создания новых лекарственных средств для борьбы с эндогенными инфекциями // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2012. № 3. С. 1–17. [Gritsenko V.A., Aminin D.L., Zurochka V.A., Zurochka A.V., Ivanov Yu.B. Some biological effects of immunomodulators of natural and synthetic origin in vitro as a basis for the development of new drugs to combat endogenous infections. *Byulleten' Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN = Bulletin of the Orenburg Scientific Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences*, 2012, no. 3, pp. 1–17. (In Russ.)]
5. Гриценко В.А., Иванов Ю.Б. Роль персистентных свойств в патогенезе эндогенных инфекций // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2009. № 4. С. 66–71. [Gritsenko V.A., Ivanov Yu.B. The role of persistent properties in the pathogenesis of endogenous infections. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2009, no. 4, pp. 66–71. (In Russ.)]
6. Добрынина М.А., Зурочка В.А., Зурочка А.В., Гриценко В.А. Сравнительный анализ влияния синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора — ZP2 на рост музейных культур бактерий родов *Staphylococcus* и *Escherichia* in vitro // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2015. № 2. С. 1–10. [Dobrynina M.A., Zurochka V.A., Zurochka A.V., Gritsenko V.A. Comparative analysis of the effect of synthetic peptide of the active site granulocyte-macrophage colony-stimulating factor — ZP2 on the growth of the museum of cultures of bacteria of the genera *Staphylococcus* and *Escherichia* in vitro. *Byulleten' Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN = Bulletin of the Orenburg Scientific Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences*, 2015, no. 2, pp. 1–10. (In Russ.)]
7. Добрынина М.А., Зурочка А.В., Тяпаева Я.В., Белозерцева Ю.П., Гриценко В.А. Оценка влияния синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора — ZP2 на рост и биопленкообразование клинических изолятов энтеробактерий in vitro // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2018. № 4. С. 1–20. [Dobrynina M.A., Zurochka A.V., Tyapayeva Ya.V., Belozertseva Yu.P., Gritsenko V.A. Evaluation of the effect of the synthetic peptide of the active center of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor — ZP2 on the growth and biofilm formation of clinical isolates of enterobacteria in vitro. *Byulleten' Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN = Bulletin of the Orenburg Scientific Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences*, 2018, no. 4, pp. 1–20. doi: 10.24411/2304-9081-2018-14011 (In Russ.)]
8. Добрынина М.А., Зурочка А.В., Тяпаева Я.В., Белозерцева Ю.В., Мругова Т.М., Гриценко В.А. Антибактериальная активность косметического средства «Ацеграм» в отношении грамотрицательных бактерий // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2017. № 4. С. 1–13. [Dobrynina M.A., Zurochka A.V., Tyapayeva Ya.V., Belozertseva Yu.V., Mrugova T.M., Gritsenko V.A. Antibacterial activity of Acegram cosmetic against gram-negative bacteria. *Byulleten' Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN = Bulletin of the Orenburg Scientific Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences*, 2017, no. 4, pp. 1–13. (In Russ.)]
9. Зурочка В.А., Зурочка А.В., Добрынина М.А., Зуева Е.Б., Гриценко В.А., Тяпаева Я.В., Белозерцева Ю.П. Анализ чувствительности клинических изолятов стафилококков к синтетическому пептиду активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) // Российский иммунологический журнал. 2015. Т. 9 (18), № 3 (1). С. 82–85. [Zurochka V.A., Zurochka A.V., Dobrynina M.A., Zueva E.B., Gritsenko V.A., Tyapayeva Ya.V., Belozertseva Yu.P. Analysis of the sensitivity of clinical isolates of staphylococci to a synthetic peptide of the active center of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *Rossiyskiy immunologicheskij zhurnal = Russian Immunological Journal*, 2015, vol. 9 (18), no. 3 (1), pp. 82–85. (In Russ.)]
10. Зурочка А.В., Суховой Ю.Г., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Петров С.А., Унгер И.Г., Костоломова Е.Г., Аргунова Е.Г., Субботин А.М., Колобов А.А., Симбирцев А.С. Антибактериальные свойства синтетических пептидов активного центра GM-CSF // Цитокины и воспаление. 2010. Т. 9, № 4. С. 32–34. [Zurochka A.V., Sukhovey Yu.G., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Petrov S.A., Unger I.G., Kostolomova E.G., Argunova E.G., Subbotin A.M., Kolobov A.A., Simbirtsev A.S. Antibacterial properties of synthetic peptides of the active site of GM-CSF. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2010, vol. 9, no. 4, pp. 32–34. (In Russ.)]
11. Иммунология: структура и функции иммунной системы / Под ред. Р.М. Хайтова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 280 с. [Immunology: structure and functions of the immune system. Ed. R.M. Khaitov. Moscow: GEOTAR-Media, 2014. 280 p. (In Russ.)]
12. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с. [Lakin G.F. Biometrics. Moscow: Higher school, 1990. 352 p. (In Russ.)]
13. Медицинские лабораторные технологии: Справочник; в 2 т. / Под ред. А.И. Карпищенко. 2-е изд., перераб. и доп. СПб.: Интермедика, 1999. Т. 2. 653 с. [Medical laboratory technologies: a handbook: (in 2 vol.). Ed. A.I. Karpishchenko. 2nd ed., revised and supplemented]. St. Petersburg: Intermedika, 1999. Vol. 2. 653 p. (In Russ.)]
14. Ронь Г.И., Еловицова Т.М. Инновационные технологии в диагностике и лечении воспалительных заболеваний пародонта. Екатеринбург: УГМА, 2011. 276 с. [Rohn G.I., Elovikova T.M. Innovative technologies in the diagnosis and treatment of inflammatory periodontal diseases. Yekaterinburg: UGMA, 2011. 276 p. (In Russ.)]

15. Слесарев В.И. Химия: Основы химии живого: учебник для вузов. СПб.: Химиздат, 2017. 784 с. [Slesarev V.I. Chemistry: Fundamentals of living chemistry. Textbook for universities. St. Petersburg: Khimizdat, 2017. 784 p. (In Russ.)]
16. Трухачева Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica. М.: ГОЭТАР-Медиа, 2013. 384 с. [Trukhacheva N.V. Mathematical statistics in biomedical research using Statistica package. Moscow: GEOTAR-Media, 2013. 384 p. (In Russ.)]
17. Улитовский С.Б. Гигиена полости рта в пародонтологии. Медицинская книга, 2006. 268 с. Ulitovskii S.B. [Oral hygiene in periodontics. St. Petersburg: Medical book, 2006, 268 p. (In Russ.)]
18. Янушевич О.О., Максимовский Ю.М., Максимовская Л.Н., Орехова Л.Ю. Терапевтическая стоматология. Учебник для вузов. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. 760 с. [Yanushevich O.O., Maksimovskiy Yu.M., Maksimovskaya L.N., Orekhova L.Ju. Therapeutic dentistry. Textbook for universities. Moscow: GEOTAR-Media, 2016. 760 p. (In Russ.)]
19. Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J., Baddour L.M., Barrett F.F., Melton D.M., Beachey E.H. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J. Clin. Microbiol.*, 1985, no. 22, pp. 996–1006.
20. Izano E.A., Izano E.A., Amarante M.A., Kher W.B., Kaplan J.B. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, no. 74 (2), pp. 470–476. doi: 10.1128/AEM.02073-07
21. Mack D., Becker P., Chatterjee I., Dobinsky S., Knobloch J.K., Peters G., Rohde H., Herrmann M. Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2004, no. 294, pp. 203–212. doi: 10.1016/j.ijmm.2004.06.015
22. Murphy J.M., Young I.G. IL-3, IL-5, and GM-CSF signaling: crystal structure of the human beta-common receptor. *Vitam. Horm.*, 2006, no. 74, pp. 1–30. doi: 10.1016/S0083-6729(06)74001-8
23. O’Gara J.P. ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2007, no. 270 (2), pp. 179–188. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00688.x
24. O’Neill E., Pozzi C., Houston P., Smyth D., Humphreys H., Ashley Robinson D., O’Gara J.P. Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related. *J. Clin. Microbiol.*, 2007, no. 45 (5), pp. 1379–1388. doi: 10.1128/JCM.02280-06
25. O’Toole G.A., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Ann. Rev. Microbiol.*, 2000, no. 54, pp. 49–79. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.49
26. Stepanović S., Vuković D., Hola V., Di Bonaventura G., Djukić S., Cirković I., Ruzicka F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, 2007, no. 115, pp. 891–899.

Авторы:

Саркисян Н.Г., д.м.н., доцент кафедры терапевтической стоматологии и преподаватель стоматологических заболеваний ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Екатеринбург, Россия; профессор отдела аспирантуры Института иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия;

Катаева Н.Н., к.х.н., доцент кафедры общей химии ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Екатеринбург, Россия;

Тузанкина И.А., д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления Института иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия;

Меликян С.Г., студентка 3 курса стоматологического факультета ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Екатеринбург, Россия;

Зурочка В.А., д.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления Института иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия; профессор кафедры пищевых и биотехнологий ФГАОУ ВО Южно-Уральский государственный университет (Национальный исследовательский университет), г. Челябинск, Россия;

Зурочка А.В., д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления Института иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия; профессор кафедры пищевых и биотехнологий ФГАОУ ВО Южно-Уральский государственный университет (Национальный исследовательский университет), г. Челябинск.

Authors:

Sarkisian N.G., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Therapeutic Dentistry and Propaedeutics of Dental Diseases, Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation; Professor of Postgraduate Studies, Institute of Immunology and Physiology Ural Regional Branch of the RAS, Yekaterinburg, Russian Federation;

Kataeva N.N., PhD (Chemistry), Associate Professor, Department of General Chemistry, Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation;

Tuzankina I.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Honored Worker of Science, Head Researcher, Laboratory of Immunology of Inflammation, Institute of Immunology and Physiology Ural Regional Branch of the RAS, Yekaterinburg, Russian Federation;

Melikyan S.G., 3rd Year Student, Faculty of Dentistry, Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation;

Zurochka V.A., PhD, MD (Medicine), Senior Researcher, Institute of Immunology and Physiology, Ural Regional Branch of the RAS, Yekaterinburg, Russian Federation; Professor of the Department of Food Technology and Biotechnology, South Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russian Federation;

Zurochka A.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Researcher, Institute of Immunology and Physiology Ural Regional Branch of the RAS, Yekaterinburg, Russian Federation; Professor of the Department of Food Technology and Biotechnology, South Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russian Federation.

КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ НА ИНФЕКЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

Г.Н. Леонова¹, О.С. Майстровская¹, В.А. Лубова¹, Н.М. Санина²

¹ ФГБНУ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, г. Владивосток, Россия

² Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, Россия

Резюме. Вакцинопрофилактика обеспечивает наиболее надежную и эффективную иммунологическую защиту против любого инфекционного заболевания. Клещевой энцефалит (КЭ) остается актуальной проблемой для территории Евразийского континента. Большое значение имеет оценка роли разных титров антител и, особенно, низких титров, которые довольно часто встречаются у вакцинированных лиц и в отдельных случаях представляют сложность при решении вопросов порога серопозитивности и уровня специфической защиты против вируса КЭ. Цель работы — на основе экспериментальных исследований *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* получить данные по обоснованию противовирусной активности специфических антител с разными титрами по отношению к высоковирулентному дальневосточному штамму вируса КЭ. Были проведены комплексные экспериментальные исследования *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*, и на основании динамики наблюдения (от 1 до 96 ч) обоснована противовирусная активность специфических антител с разными титрами (от 1:100 до 1:3200) по отношению к эпидемически значимой дозе вируса КЭ, равной $3 \log$ ТЦД/мл. Показано *in vitro*, что антитела класса IgG в титре 1:100 во все сроки наблюдения оказывали слабое нейтрализующее действие по отношению к вирусу КЭ. Иммуноглобулин с титром 1:400 спустя 72 ч после инфицирования тормозил накопление штамма Dal'negorsk вируса КЭ на $2 \log$ БОЕ/мл, с титром 1:3200 во все сроки наблюдения полностью задерживал размножение вируса. На экспериментальной модели *ex vivo* (кровь вакцинированных лиц с разными титрами антител к вирусу КЭ) и *in vivo* (неинбредные белые мыши) показана замедленная элиминация вируса при титрах антител 1:100 и 1:200 и быстрая (спустя 1–2 суток) — при титрах антител более чем 1:400. Титр антител 1:400 можно принять за порог защиты от вируса КЭ. Чтобы принять правильное решение о сроках ревакцинации, первоначально рекомендовано исследование крови в ИФА на напряженность иммунитета к вирусу КЭ. Лицам с антителами в титрах 1:100 и 1:200 следует предлагать обязательное проведение ревакцинации. Такой подход является наиболее результативным способом повышения эффективности вакцинопрофилактики КЭ.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита, защитный титр антител, динамика нейтрализации вируса *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo*.

Адрес для переписки:

Леонова Галина Николаевна
690087, Россия, г. Владивосток, ул. Сельская, 1,
ФГБНУ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени
Г.П. Сомова Минобрнауки России.
Тел.: 8 (966) 280-28-45 (служебн.).
E-mail: galinaleon41@gmail.com

Contacts:

Galina N. Leonova
690087, Russian Federation, Vladivostok, Selskaya str., 1,
Somov Institute of Epidemiology and Microbiology,
Russian Ministry of Education and Science.
Phone: +7 (966) 280-28-45 (office).
E-mail: galinaleon41@gmail.com

Библиографическое описание:

Леонова Г.Н., Майстровская О.С., Лубова В.А., Санина Н.М. Комплексная оценка влияния специфических антител на инфекционную активность вируса клещевого энцефалита // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 3–4. С. 559–567. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-559-567

Citation:

Leonova G.N., Majstrovskaya O.S., Lubova V.A., Sanina N.M. Comprehensive assessment of specific antibodies on infectious activity of tick-borne encephalitis virus // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 3–4, pp. 559–567. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-559-567

Работа выполнена в рамках научных проектов: (0545-2014-0011) Федерального агентства научных организаций, РФФ (15-15-00035-Р)

© Леонова Г.Н. и соавт., 2019

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2019-3-4-559-567>

COMPREHENSIVE ASSESSMENT OF SPECIFIC ANTIBODIES ON INFECTIOUS ACTIVITY OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS

Leonova G.N.^a, Majstrovskaya O.S.^a, Lubova V.A.^a, Sanina N.M.^b

^a Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russian Federation

^b Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. Vaccines for prophylactic immunization provide the most reliable and effective protection against the vast majority of infectious diseases. Tick-borne encephalitis (TBE) represents a high-priority medical issue at the territory of the Eurasian continent. Of great importance is assessing a role of distinct antibody titers especially low titers, observed quite often in vaccinated individuals, sometimes posing obstacles in determining a threshold of seropositivity as well as the level of specific protection against TBE virus. We aimed at obtaining data to assess antiviral activity of virus-specific antibodies with distinct titer levels based on the *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* experimental studies with a highly virulent Far-Eastern strain of tick-borne encephalitis virus. The *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* comprehensive experimental studies with a highly virulent Far-Eastern strain of tick-borne encephalitis virus (TBEV) were conducted and the dynamics of antiviral activity of virus-specific antibodies at variable titers (1:100–1:3200) was measured (timeframe ranged within 1–96 hours p.i.) to provide a rationale for evaluating the antiviral immune response. It was found that the *in vitro* experiments demonstrated that the IgG at 1:100 titer exerted a weak anti-TBEV neutralizing effect at all time-points examined. The IgG 1:400 titer caused a 2 log PFU/mL decline in TBEV Dal strain yield at 72 h post-infection, whereas at 1:3200 titer it completely suppressed TBEV replication throughout the observation period. The *ex vivo* experiments with blood serum obtained from vaccinated subjects demonstrating a range of TBEV antibody titers (sera from vaccinated individuals with varying anti-TBEV antibody titers) and *in vivo* (outbred white mice) experiments revealed a delayed virus elimination for antibody titers at 1:100 and 1:200 as well as rapid virus elimination (1–2 days p.i.) for antibody titers greater than 1:400. Thus, antibody titer at 1:400 may be considered as the universal anti-TBEV protection threshold. In order to properly conclude regarding the revaccination schedule it is advised to start with testing blood serum for durability of anti-TBEV immune response. Subjects with TBEV antibody titers at 1:100 and 1:200 should be strongly recommended to undergo a mandatory revaccination. Such an approach is believed to be the most effective way toward enhancing efficacy of vaccine-mediated protection against TBE.

Key words: tick-borne encephalitis, protective antibody titer, dynamics of virus neutralization *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo*.

Введение

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), широко распространенный на Евразийском континенте, является членом рода *Flavivirus*, семейство *Flaviviridae*. Заболеваемость КЭ регистрируется более чем в 30 странах Европы и Азии в умеренной климатической зоне [4]. Резкий подъем заболеваемости клещевым энцефалитом (КЭ) в 1990-х гг. на всех территориях континента значительно активизировал научный интерес к изучению этой проблемы. Установлено, что геном ВКЭ содержит РНК положительной полярности длиной около 11 000 оснований, которая кодирует один белок — полипротеин длиной 3414 аминокислотных остатков. Полипротеин, в свою очередь, в процессе созревания расщепляется вирусными и клеточными протеазами с образованием 10 белков, 3 из которых являются структурными (М, С, Е). На основе генетической структуры и антигенных свойств вируса КЭ был подразделен на 3 субтипа: Дальневосточный (I), Европейский (II) и Сибирский (III) [16, 18].

Вирус КЭ Европейского субтипа представляет меньшую опасность для человека, а по мере продвижения вируса на восток тяжесть течения инфекционного процесса и уровень ле-

тальности при этом заболевании возрастает [3]. На Дальнем Востоке России летальность при КЭ остается самой высокой: за 80-летний период изучения она составляет в среднем 17,0% [5].

При многих вирусных инфекциях с помощью вакцинопрофилактики достигается наиболее надежная и эффективная защита. Клещевой энцефалит как особо опасная инфекция для человека не является исключением. Практика применения противоклещевых вакцин различного производства показывает, что иммунизация населения является ключевым звеном в плане массовой профилактики КЭ на высокоэндемичных территориях [4, 7, 11, 17].

Особое значение имеет оценка роли низких титров специфических антител, которые довольно часто встречаются у вакцинированных лиц и представляют сложность в отдельных случаях при решении вопросов порога серопозитивности и специфической защиты против вируса КЭ.

Цель исследований — на основе экспериментальных исследований *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* получить данные по обоснованию противовирусной активности специфических антител с разными титрами по отношению к высоковирулентному дальневосточному штамму вируса КЭ.

Материалы и методы

В работе был использован штамм Dal'negorsk (Dal') вируса КЭ дальневосточного субтипа, выделенный в 1973 г. из мозга умершего больного очаговой формой КЭ. Ранее мы провели полногеномное секвенирование штамма (номер в GenBank FJ402886) и изучили его биологические свойства [15, 21]. Исходный титр штамма, взятого в настоящее исследование на 6 пассаже, составлял — $8,0 \log \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$.

Количество антител в исследуемых образцах определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) и реакции нейтрализации (РН). Для определения антител класса IgG использовали «Vecto-TBE-IgG» набор (АО «Вектор-Бест», Новосибирск) согласно инструкции производителя.

Для определения нейтрализующих антител использовали однодневный монослой перевиваемых клеток СПЭВ, выращенный на 24-луночных планшетах. Штамм Dal' вируса КЭ, содержащий стандартную дозу вируса $2 \log \text{ТЦД}/\text{мл}$, соединяли с 2-кратными разведениями от 1:10 до 1:3200 исследуемых образцов сывороток крови. Смесь выдерживали при температуре 37°C в течение 1 ч с последующим нанесением на монослой клеток СПЭВ. Результаты инфекционной активности не нейтрализованного вируса учитывали на 5–6 сутки.

Описание эксперимента in vitro. В работе использован «Иммуноглобулин человека против клещевого энцефалита» производства «НПО «Микроген» (серия П609), титр в ИФА составлял 1:3200. Приготовлено 3 разведения иммуноглобулина (IgG) с титрами в ИФА 1:100, 1:400 и 1:3200. Затем 0,9 мл каждого разведения IgG соединяли с 0,1 мл вирусосодержащей суспензии штамма в количестве $4,0 \log \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$, после чего рабочая доза вируса в опыте составила $3,0 \log \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ (МОИ 0,001 $\text{ТЦД}_{50}/\text{клетку}$). Приготовленные пробы помещали на 2 ч в холодильник $+4^\circ\text{C}$, которыми затем заражали монослой клеток СПЭВ на пробирках (по 3 пробирки на каждую пробу). После 1 ч контакта в термостате монослой зараженных клеток трижды промывали средой 199, заливали поддерживающей средой и помещали в термостат для дальнейшего наблюдения за накоплением вируса в клетках и в культуральной жидкости спустя 3, 24, 48, 72 ч после инфицирования. Для получения средних показателей образцы из трех пробирок каждого срока наблюдения объединяли. Из смеси клеток готовили слайды на предметных стеклах для подсчета процента клеток с антигеном вируса, используя непрямой метод иммунофлуоресценции (НМФА). Антиген вируса КЭ внутри клеток выявляли с помощью нанесения иммунной сыворотки

против вируса КЭ и затем флуоресцирующих иммуноглобулинов (ФИТС) в рабочем разведении, указанном в инструкции изготовителя (Филиал «МЕДГАМАЛ», ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ). Просмотр слайдов проводили на флуоресцентном микроскопе MC-200 TF (Австрия). Для вычисления процента антигенсодержащих клеток СПЭВ, инфицированных экспериментальными пробами, для каждого образца в пяти микроскопных полях (100 клеток на поле) просчитывали общее количество клеток и антигенпозитивных клеток. Количество вирусинфицированных клеток, окрашенных положительно, к общему количеству клеток, выражали как процент антигенположительных клеток.

В надосадочной культуральной жидкости экспериментальных проб определяли титр вируса. Десятикратными разведениями этих проб заражали односуточный монослой клеток СПЭВ, приготовленный на 24-луночных планшетах. После 1 ч контакта при температуре 37°C зараженный монослой клеток промывали культуральной средой 199, затем добавляли поддерживающую среду 199 с гентамицином и с 1% эмбриональной сыворотки коров и планшеты помещали в CO_2 -термостат. Учет количества вируса в экспериментальных пробах проводили на 6 сутки в БОЕ/мл.

Описание эксперимента ex vivo. В опытах *ex vivo* была использована кровь лиц, привитых против КЭ с определенным титром антител (IgG) в крови по данным ИФА. Исходный титр антител образца № 1 — 1:200, № 2 — 1:400, № 3 — 1:800, № 4 — 1:1600, № 5 — 1:3200. Для эксперимента кровь у этих лиц забирали шприцом из локтевой вены, помещали в пробирки с ЭДТА. Для разведения крови была подготовлена среда RPMI 1640 (Sigma), содержащая 0,3 мг/мл глутамин (Sigma) и 80 мкг/мл гентамицина. Для каждого образца было подготовлено по 6 пробирок, содержащих 1 мл среды и 0,9 мл цельной крови. Затем во все пробирки добавлен вирус КЭ ($5,0 \log \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$) по 0,1 мл. Заражающая доза вируса стала равна $4,0 \log \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$, а титры антител во всех образцах стали ниже на одно разведение по сравнению с исходным титром. Все пробы помещали в термостат при 37°C , наблюдения за содержанием вируса в экспериментальных пробах проводили через 1, 3, 24, 48, 72, 96 ч. Учет количества не нейтрализованного вируса проводили на 6 сутки в БОЕ/мл.

Описание эксперимента in vivo. Надосадочную жидкость (опыты *ex vivo*) экспериментальных проб, собранную спустя 1–72 ч, инокулировали по 0,03 мл в мозг неинбредным белым мышам весом 12 г (по 10 мышей на точку). Срок наблюдения составил 21 сутки. Инфекционная актив-

ность вируса в экспериментальных образцах определяли по проценту умерших животных и их средней продолжительности жизни (СПЖ).

Животные содержались в условиях вивария регламентируемых приказом Минздрава СССР № 1179 от 10.10.1983 г. Опыты проводили в соответствии с приказами Минздрава СССР № 755 от 12.09.1977 г. и № 701 от 27.07.1978 г. «Об обеспечении принципов гуманного обращения с животными».

Результаты

В ранее опубликованных работах [20, 22] нами были определены уровни иммунологической памяти (1:100) и защитного титра (1:400) специфических антител при действии эпидемически значимой заражающей дозы вируса КЭ, равной $3,0 \log TCID_{50}/ml$. В настоящем исследовании мы расширили задачи, которые заключались в определении *in vitro* количества остаточного вируса после взаимодействия штамма Dal' вируса КЭ со специфическими антителами (IgG в титрах 1:100, 1:400 и 1:3200) в динамике наблюдения (3, 24, 48, 72 ч). Для этого одновременно были проведены наблюдения за процессом внутриклеточного и внеклеточного накопления штамма Dal' вируса КЭ в экспериментальных пробах с разными титрами антител IgG в сравнении с контролем вируса (без антител).

Под действием антител класса IgG внутриклеточное накопление антигена вируса КЭ более активно происходило при низком титре 1:100, замедленно — при титре 1:400. Антиген вируса КЭ практически не обнаружен в зараженных клетках СПЭВ пробами с IgG в титре 1:3200 (рис. 1А). Кроме того, спустя 72 ч интенсивность специ-

фического свечения антигена вируса в клетках СПЭВ, зараженных опытными пробами (с титрами IgG 1:100 и 1:400) по сравнению с контролем, наглядно показана с помощью конфокальной микроскопии. На рисунке 2 (см. III обложку) видно, что светящихся клеток опытной пробы (IgG с титром 1:100) много, но свечение антигена менее интенсивно по сравнению с контролем вируса. При титре IgG 1:400 светящиеся клетки встречались значительно реже.

Об уровне не нейтрализованного вируса под действием специфических антител класса IgG можно судить не только по показателям антигена в клетках, но и по выявлению вируса в культуральной жидкости клеток СПЭВ, зараженных указанными пробами. На рисунке 1Б видно, что антитела IgG в титре 1:100 во все сроки наблюдения оказывали слабое нейтрализующее действие по отношению к вирусу КЭ, накопление которого по сравнению с контролем наблюдалось с запозданием на 1 сутки. Иммуноглобулин в титре 1:400 спустя 72 ч тормозил на $2 \log BOE_{50}/ml$ накопление штамма Dal' в культуральной жидкости. И только IgG с титром 1:3200 во все сроки наблюдения *in vitro* полностью задерживал размножение вируса КЭ.

Следующим этапом экспериментов явилось изучение *ex vivo* защитного противовирусного действия специфических антител с разными титрами (1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600) по отношению к штамму Dal' вируса КЭ. Динамика постепенного снижения количества инфекционной активности вируса в надосадочной жидкости экспериментальных проб крови, исследованная с помощью бляшкообразующего теста на модели клеток СПЭВ, показана на рисунке 3. Скорость элиминации вируса зависела

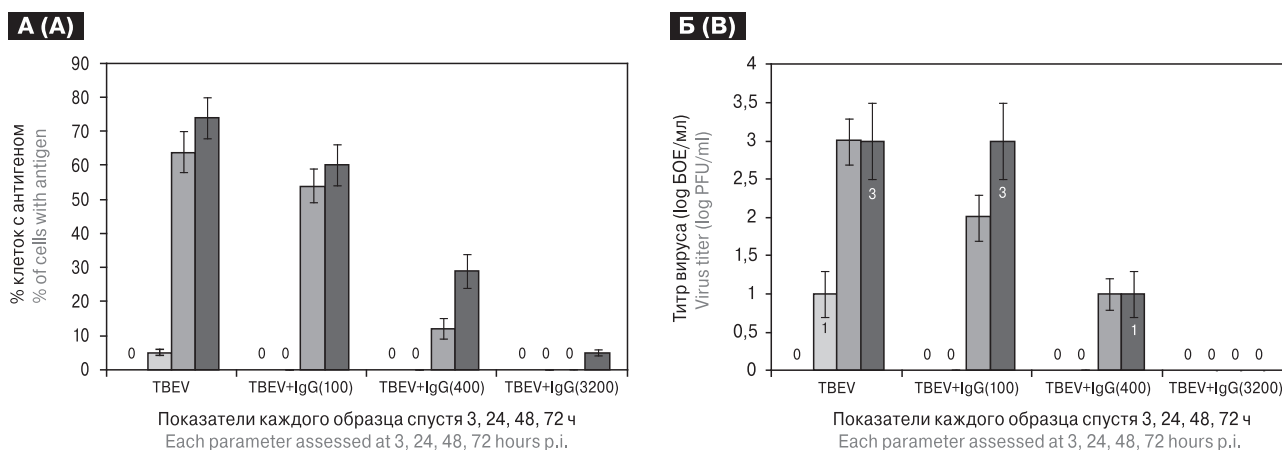


Рисунок 1. Динамика накопления антигена в клетках (А) и вируса в культуральной жидкости (Б) клеточной культуры СПЭВ, зараженной вирусом КЭ (контроль вируса) и вирусом КЭ+IgG в титрах 1:100, 1:400, 1:3200 (опытные пробы) спустя 3, 24, 48, 72 ч после инфицирования

Figure 1. Dynamics of intracellular antigen (A) and extracellular virus (B) accumulation in TBЕV-infected PKЕ cells (virus control) and TBЕV IgG with titer level of 1:100, 1:400 and 1:3200 (experimental samples) at 3 h, 24 h, 48 h and 72 h p.i.

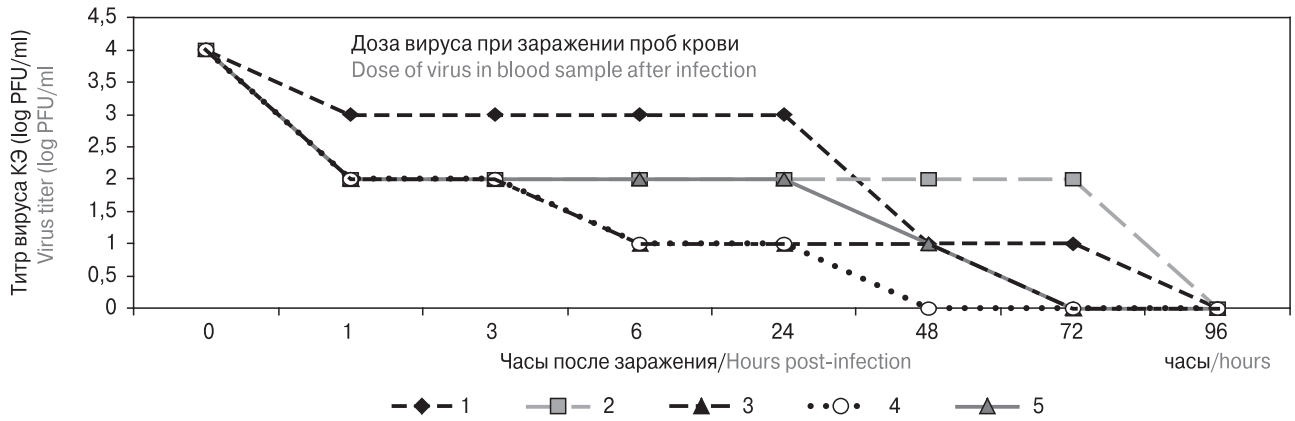


Рисунок 3. Динамика элиминации вируса КЭ в зараженных вирусом КЭ пробах крови лиц, содержащих антитела в разных титрах (№ 1 — 1:100; № 2 — 1:200; № 3 — 1:400; № 4 — 1:800; № 5 — 1:1600)

Figure 3. Dynamics of TBEV elimination in blood samples from TBEV-vaccinated subjects

Примечание. Пробы крови заражены дальневосточным штаммом Dal'negorsk вируса КЭ в титре 4 log БОЕ/мл.

Накопление не нейтрализованного вируса в образцах наблюдали путем заражения ими односуточного монослоя клеток СПЭВ. Учет опыта проводили на 6 сутки по количеству БОЕ/мл.

Note. Blood samples with varying antibody titer levels (No. 1 — 1:100; No. 2 — 1:200; No. 3 — 1:400; No. 4 — 1:800; No. 5 — 1:1600) were mixed with 4 log PFU/mL of Far-Eastern TBEV Dal'negorsk strain. The mixture was used for inoculation of a one-day-old PKE cell monolayer. Virus yield was measured on day 6 p.i. by using a plaque test, expressed as PFU/mL.

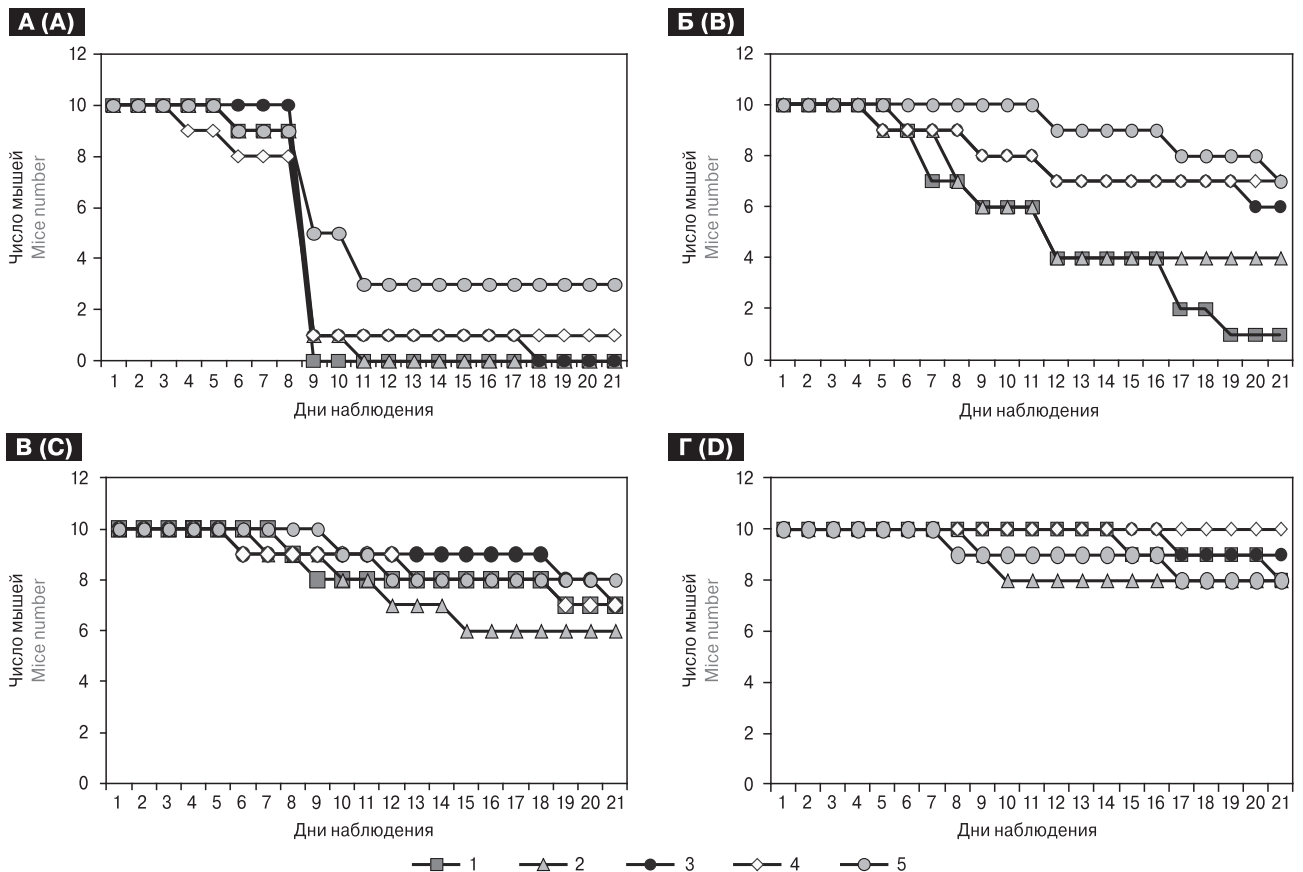


Рисунок 4. Динамика проявления инфекционных свойств не нейтрализованного вируса у белых мышей, зараженных экспериментальными пробами опыта *ex vivo* (элиминация вируса КЭ под действием антител с разными титрами в крови людей) в разные сроки наблюдения (А — 1 ч, Б — 24 ч, В — 48 ч, Г — 72 ч после инфицирования)

Figure 4. The pattern of infectious process in outbred white mice inoculated with experimental samples used in the *ex vivo* experiments (anti-TBEV effect of antibodies with varying titer levels measured in blood serum from TBEV-vaccinated subjects) at different time points post-infection (A — 1 h, B — 24 h, C — 48 h, D — 72 h p.i.)

Таблица 1. Динамика показателей (процент выживаемости и СПЖ мышей) противовирусной активности антител с разными титрами (1:100; 1:200; 1:400; 1: 800; 1:1600) в отношении вируса КЭ в разные сроки наблюдения (спустя 1 ч, 24 ч, 48 ч и 72 ч)

Table 1. Dynamics of parameters (% survival and average mouse life expectancy) of anti-TBEV antibody activity at varying titer levels (1:100; 1:200; 1:400; 1: 800; 1:1600) at different time points post-infection (1 h, 24 h, 48 h and 72 h p.i.)

№ образца/титр IgG No. of sample/IgG titer	1 ч (h p.i.)		24 ч (h p.i.)		48 ч (h p.i.)		72 ч (h p.i.)	
	СПЖ Average mouse life expectancy	% выживших мышей % survivors of mice	СПЖ Average mouse life expectancy	% выживших мышей % survivors of mice	СПЖ Average mouse life expectancy	% выживших мышей % survivors of mice	СПЖ Average mouse life expectancy	% выживших мышей % survivors of mice
1/(1:200)	8,7	0	11,0	10	18,3	70	8,7	0
2/(1:400)	8,9	0	13,8	40	17	60	8,9	0
3/(1:800)	9,9	0	17,2	60	19,3	70	9,9	0
4/(1:1600)	9,6	10	17,3	70	18,4	70	9,6	10
5/(1:3200)	12,7	30	17,6	70	19,1	80	12,7	30
Контроль дозы вируса в эксперименте Experimental TBEV dose control	10,4	30					10,4	30

от исходного титра антител в изучаемых пробах крови. Полная элиминация вируса в пробе 4 (1:800) наступила через 48 ч, в пробах 3 (1:400) и 5 (1:1600) — через 72 ч, в пробах 1 (1:100) и 2 (1:200) — только через 96 ч после инфицирования. Особенно замедленно снижалось количество вируса в пробе 1, в которой вирус в титре 3 log БОЕ/мл регистрировали до 24 ч наблюдения, в титре 1 log БОЕ/мл — спустя 48–72 ч, и только через 96 ч вирус не обнаруживали.

Несмотря на то что бляшкообразующий тест определял наличие вирусных частиц в экспериментальных пробах, антиген вируса КЭ во все сроки наблюдения (от 1 до 96 ч после инфицирования) по данным ИФА не был зарегистрирован ни в одной пробе.

Полученные результаты *ex vivo* требовали дополнительной проверки инфекционной активности вируса на модели неинбредных белых мышей. На рисунке 4 и в таблице 1 показана противовирусная активность антител с разными титрами в отношении вируса КЭ в разные сроки наблюдения (1, 24, 48 и 72 ч). Так, экспериментальные животные, зараженные образцом крови спустя 1 ч после его инфицирования вирусом КЭ, практически не выживали. Исключение составила проба 5 (1:1600), у которой показатель СПЖ животных был выше, чем в контроле при 30% выживаемости мышей в опыте и в контроле (табл. 1, рис. 4А). Спустя 24 ч после контакта проб крови с вирусом выживаемость мышей в зависимости от титра IgG в пробах повышалась, за исключением пробы 1, показатели которой все также были низкими (табл. 1, рис. 4Б). Спустя 48 ч выживаемость животных, зараженных всеми пробами, в том числе и пробой 1, значительно повысилась (табл. 2, рис. 4В), и только спустя 72 ч эти показатели достигли 80–100% выживаемости, а СПЖ мышей составила более 20 дней (табл. 1, рис. 4Г). Это свидетельствовало о том, что во всех экспериментальных пробах крови спустя 72 ч после ее инфицирования почти полностью произошла нейтрализация вируса КЭ под действием антител с титрами от 1:100 до 1:1600.

Кроме того, наблюдение за количеством антител по данным ИФА и реакции нейтрализации в экспериментальных пробах *ex vivo* показало, что титры IgG оставались на исходных уровнях, то есть не изменялись во все сроки наблюдения. Исключение составила проба 1, показатели которой снижались в обеих реакциях до отрицательных результатов (табл. 2).

Обсуждение

Понятие защитного титра антител появилось при проведении исследований по иммунологической активности вакцин. При этом эффек-

Таблица 2. Показатели количества антител в опыте *ex vivo* по данным ИФА и нейтрализационного теста в разные сроки наблюденияTable 2. Level of neutralizing antibody titers in the *ex vivo* experiment at different time points post-infection based on ELISA and virus neutralization assay

№ образцов крови No. of blood samples	Титр IgG в крови до инфицирования ВКЭ IgG titer in the blood before TBEV infection	Титр антител в ИФА/в РН после инфицирования через: Antibody titers by ELISA/Nt post-infection at:							
		0 ч/ч	1 ч/ч	3 ч/ч	6 ч/ч	24 ч/ч	48 ч/ч	72 ч/ч	96 ч/ч
1	200/20	100	0	0	0	0/0	0	0	0/0
2	400/40	200	200	200	200	200/20	200	200	200/20
3	800/80	400	400	400	400	400/80	400	400	400/40–80
4	1600/80	800	800	800	800	800/80	800	800	800/40–80
5	3200/3200	1600	1600	1600	1600	1600/1280	1600	1600	1600/1280

тивность профилактических вакцин против какой-либо инфекции оценивается по уровню иммунологических показателей, обеспечивающих защитное действие [1]. Представление о защитном титре антител у лиц, вакцинированных против КЭ, в литературных источниках встречается нечасто [22], и до настоящего времени является предметом дискуссии [10, 14]. Впервые титр гемагглютинирующих антител 1:10 к вирусу КЭ был определен как защитный в 1980 г., австрийскими исследователями [19]. В последние годы этому вопросу стали уделять внимание в связи с тем, что у лиц, привитых против КЭ, по данным ИФА зачастую (до 40–44%) формируются невысокие (1:100) титры антител класса IgG [15]. Видимо, поэтому у вакцинированных лиц могут регистрироваться лихорадочные формы инфекции, а в редких случаях описаны даже летальные исходы [8].

В то же время у некоторых людей после курса первичной вакцинации могут вырабатываться антитела с высокими титрами, которые сохраняются долго [4, 20]. В ранее опубликованных работах [6, 20, 22] нами были определены уровни иммунологической памяти (1:100) и защитного титра (1:400) специфических антител при действии эпидемически значимой заражающей дозы вируса КЭ, равной $3,0 \log \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$. Мы посчитали, что такой уровень специфических антител способен защитить пациентов на ранних стадиях инфицированности сразу после укуса клеща, содержащего вирус КЭ. Однако в настоящее время защитным титром антител по данным ИФА официально принято считать 1:100 и по реакции нейтрализации — 1:10 [2, 12].

В настоящих исследованиях показана комплексно на моделях *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* динамика элиминации вируса КЭ под действием специфических антител с разными титрами.

На модели *in vitro* получены доказательства прямого нейтрализующего действия антител класса IgG против вируса КЭ. При этом в динамике наблюдения до 72 ч после инфицирования

показано, что антитела в титре 1:400 не способны полностью элиминировать вирус КЭ в титре $3,0 \log \text{ТЦД}/\text{мл}$, и только антитела с высокими титрами нейтрализуют вирус и защищают монослой экспериментальной культуры клеток СПЭВ от цитопатического действия вируса КЭ.

На экспериментальной модели *ex vivo* (кровь вакцинированных лиц с разными титрами антител к вирусу КЭ) были получены дополнительные доказательства действия специфических антител в сочетании с другими факторами. Используя эту биологическую модель — наиболее приближенную к естественной модели (человек, вакцинированный против КЭ), мы показали, что в пробах со специфическими антителами в титрах более чем 1:400 нейтрализация вируса происходила быстро (спустя 24 ч). Под действием IgG в титрах 1:100 и 1:200 элиминация вируса тоже происходила, но в более поздние сроки на 3–4 сутки после инфицирования проб крови. Кроме того, мы обратили внимание также на тот факт, что титры антител (по данным ИФА и реакции нейтрализации) в надосадочной жидкости опытных проб *ex vivo* оставались на одном уровне во все сроки наблюдения, за исключением проб с титром антител 1:100. Это дает нам основание считать, что взаимодействие вируса КЭ со специфическими антителами не снижает их титры в том случае, если количество более чем 1:200. Замедленная элиминация вируса происходила под действием антител с низкими показателями, снижаясь до отрицательных значений, что указывало на быстрое истощение запаса антител в этих пробах. Видимо, такие обстоятельства (низкое количество антител в присутствии вируса КЭ более чем $3,0 \log \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$) могут способствовать возникновению случаев КЭ у вакцинированных лиц, неоднократно описанных в литературе [8, 9]. Так какой же титр антител способен защитить от развития инфекционного процесса? Видимо, этот показатель также индивидуален и включает комплекс факторов —

количество вируса, количество антител и индивидуальные особенности макроорганизма. Вышепредставленные данные помогают понять причины разных исходов инфекции у вакцинированных лиц после укуса клеща, зараженного вирусом. Чтобы принять правильное решение о сроках ревакцинации, первоначально можно рекомендовать исследование крови на напряженность иммунитета к вирусу КЭ. Исходя из данных, полученных ранее [6, 22], а также данных настоящего исследования, мы пришли к выводу о том, что быстрая элиминация вируса (спустя 1–2 суток) может происходить у вакцинированных лиц с антителами в титрах 1:400 и более. Лицам с антителами в сыворотке крови в титрах 1:100 и 1:200, видимо, следует предлагать обязательное проведение ревакцинации.

Учитывая длительность сохранения поствакцинальных антител, схема иммунизации против КЭ, как это принято в европейских странах [13, 17], предусматривает проведение ревакцинации через 5 лет после полного курса вакцинации. Российские исследователи [2] также предлагают изменения в курсе ревакцинации путем увеличения интервала с 3 до 6 лет. Настоящие экспериментальные исследования позволяют согласиться с мнением этих авторов. Представленные результаты дают основание считать, что в рамках персонифицированной медицины вышеизложенный подход имеет не только социально-экономическое значение, но и является наиболее результативным способом повышения эффективности вакцинопрофилактики КЭ.

Список литературы/References

1. Брико Н.И. Критерии оценки эффективности вакцинации // Вакцинация. 2000. Т. 5, № 11. [Briko N.I. Criteria of vaccination effectiveness assessment. *Vaksinatsiya = Vaccination*, 2000, vol. 5, no. 11. (In Russ.)]
2. Есюнина М.С., Романенко В.В., Киячина А.С. Длительность сохранения постпрививочного иммунитета к вирусу клещевого энцефалита после ревакцинаций // Медицинская вирусология. 2015. Т. 29, № 2. С. 132. [Yesyunina M.S., Romanenko V.V., Kilyachina A.S. Duration of post-vaccination immunity against tick-borne encephalitis following booster doses. *Meditsinskaya virusologiya = Medical Virology*, 2015, vol. 29, no 2, p. 132. (In Russ.)]
3. Иерусалимский А.П. Клещевой энцефалит. Новосибирск: Наука, 2001. 359 с. [Jerusalemky A.P. Tick-borne encephalitis. *Novosibirsk: Nauka*, 2001. 359 p. (In Russ.)]
4. Леонова Г.Н. Клещевой энцефалит: актуальные аспекты. М.: И.В. Балабанов, 2009. 168 с. [Leonova G.N. The tick-borne Encephalitis: actual aspects. *Moscow: I.V. Balabanov*, 2009. 168 p. (In Russ.)]
5. Леонова Г.Н., Беликов С.И., Кондратов И.Г. Современный взгляд на дальневосточную популяцию вируса клещевого энцефалита // Медицинская вирусология. 2017. Т. 31, № 1. С. 32. [Leonova G.N., Belikov S.I., Kondrstov I.G. A modern view of the Far Eastern population of the tick-borne encephalitis virus. *Meditsinskaya virusologiya = Medical Virology*, 2017, vol. 31, no. 1, p. 32. (In Russ.)]
6. Леонова Г.Н., Лубова В.А., Калинин А.В. Значение уровня концентрации специфических антител в элиминации разных штаммов вируса клещевого энцефалита // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2017. Т. 2, № 93. С. 50–56. [Leonova G.N., Lubova V.A., Kalinin A.V. The effect of the level of specific antibodies on elimination of different tick-borne encephalitis virus strains. *Epidemiologiya i vakcinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccine Prevention*, 2017, vol. 2, no. 93, pp. 50–56. doi: 10.31631/2073-3046-2017-16-2-50-54 (In Russ.)]
7. Онищенко Г.Г., Федоров Ю.М., Пакскина Н.Д. Организация надзора за клещевым вирусным энцефалитом и меры по его профилактике в Российской Федерации // Вопросы вирусологии. 2007. № 5. С. 8–10. [Onishchenko G.G., Fedorov Yu.M., Pakskina N.D. Organization of supervision for tick-borne encephalitis and measures on its preventive maintenance in the Russian Federation. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2007, no. 5, pp. 8–10. (In Russ.)]
8. Погодина В.В. Актуальные проблемы клещевого энцефалита на рубеже XX–XXI веков // Медицинская вирусология. 2015. Т. 29, № 2. С. 24–32. [Pogodina V.V. Actual problems of tick-borne encephalitis at the turn of XX–XXI centuries. *Meditsinskaya virusologiya = Medical Virology*, 2015, vol. 29, no. 2, pp. 24–32. (In Russ.)]
9. Погодина В.В., Левина Л.С., Скрынник С.М., Травина Н.С., Карань Л.С., Колясникова Н.М., Кармышева В.Я., Герасимов С.Г., Маленко Г.В., Перминов Л.В., Попов М.А., Бочкова Н.Г. Клещевой энцефалит с молниеносным течением и летальным исходом у многократно вакцинированного пациента // Вопросы вирусологии. 2013. № 2. С. 33–37. [Pogodina V.V., Levina L.S., Skrynnik S.M., Travina N.S., Karan L.S., Kolyasnikova N.M., Kamysheva V.Ya., Gerasimov S.G., Malenko G.V., Perminov L.V., Popov M.A., Bochkova N.G. Tick-borne encephalitis with fulminant course and lethal outcome in patients after plural vaccination. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2013, no. 2, pp. 33–37. (In Russ.)]
10. Погодина В.В., Щербинина М.С., Левина Л.С., Бочкова Н.Г. Изучение защитного титра антител против сибирского подтипа вируса клещевого энцефалита у вакцинированного населения // Медицинская вирусология. 2017. Т. 31, № 1. С. 39. [Pogodina V.V., Shcherbinina M.S., Levina L.S., Bochkova N.G. Study of the protective titer of antibodies against the Siberian subtype of tick-borne encephalitis virus in the vaccinated population. *Meditsinskaya virusologiya = Medical Virology*, 2017, vol. 31, no. 1, p. 39. (In Russ.)]
11. Романенко В.В., Киячина А.С., Есюнина М.С., Анкудинова А.В., Пименова Т.А. Эффективность программы массовой иммунопрофилактики клещевого энцефалита // Биопрепараты. 2008. № 2. С. 9–14. [Romanenko V.V., Kilyachina A.S., Yesyunina M.S. Ankudinova A.A., Pimenova T.A. Effectiveness of the mass immunoprophylaxis program of tick-borne encephalitis. *Biopreparaty = Biopreparations*, 2008, no. 2, pp. 9–14. (In Russ.)]
12. СП 3.1.3. 2352-08 «Профилактика клещевого вирусного энцефалита». [SP 3.1.3.2352-08. «Prevention of tick-borne encephalitis» (In Russ.)]

13. Хайнц Ф., Хольцманн Х., Эссл А., Кундт М. Анализ эффективности вакцинации населения природных очагов Австрии против клещевого энцефалита // Вопросы вирусологии. 2008. Т. 53, № 2. С. 19–27. [Heinz F.X., Holzmann H., Essl A., Kundt M. Analysis of the efficiency of tick-borne encephalitis vaccination in the population in the natural foci of Austria. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2008, vol. 53, no. 2, pp. 19–27. (In Russ.)]
14. Чернохаева Л.Л., Майкова Г.Б., Рогова Ю.В., Романенко В.В., Есюнина М.С., Анкудинова А.А., Килячина Е.С., Ворович М.Ф., Карганова Г.Г. Сравнительная оценка серологических методов оценки защищенности населения от ВКЭ // Медицинская вирусология. 2017. Т. 31, № 1. С. 52. [Chernokhaeva L.L., Maikova G.B., Rogova Yu.V., Romanenko V.V., Yesyunina M.S., Ankudinova A.A., Kilyachina A.S., Vorovoch M.F., Karganova G.G., Comparative assessment of serological methods of assessment of security of the population from TBEV. *Meditinskaya virusologiya = Medical Virology*, 2017, vol. 31, no. 1, p. 52. (In Russ.)]
15. Belikov S.I., Kondratov I.G., Potapova U.V., Leonova G.N. The relationship between the structure of the tick-borne encephalitis virus strains and their pathogenic properties. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 4. doi: 10.1371/journal.pone.0094946
16. Ecker M., Allison S.L., Meixner T., Heinz F.X. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europa and Asia. *J. Gen. Virol.*, 1999, no. 80, pp. 179–185. doi: 10.1099/0022-1317-80-1-179
17. Heinz F.X., Kunz C. Tick-borne encephalitis and the impact of vaccination. *Arch. Virol.*, 2004, vol. 18, pp. 201–205.
18. King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *San Diego: Elsevier*, 2012, pp. 1003–1020.
19. Kunz C.H., Heinz F., Hofmann H. Immunogenicity and reactogenicity of a highly purified vaccine against tick-borne encephalitis. *J. Med. Virol.*, 1980, no. 6, pp. 103–109. doi: 10.1002/jmv.1890060202
20. Leonova G.N., Belikov S.I., Kondratov I.G., Takashima I. Comprehensive assessment of the genetics and virulence of tick-borne encephalitis virus strains isolated from patients with inapparent and clinical forms of the infection in the Russian Far East. *Virology*, 2013, vol. 443, pp. 89–98. doi: 10.1016/j.virol.2013.04.029
21. Leonova G.N., Pavlenko E.V. Characterization of neutralizing antibodies to Far Eastern of tick-borne encephalitis virus subtype and the antibody avidity for four tick-borne encephalitis vaccines in human. *Vaccine*, 2009, vol. 27, no. 21, pp. 2899–2904. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.02.069
22. Leonova G.N., Pavlenko E.V., Maistrovskaya O.S., Chausov E.V. Protective antibody titer for patients vaccinated against tick-borne encephalitis. *Procedia Vaccinol.*, 2011, vol. 4, pp. 84–91. doi: 10.1016/j.provac.2011.07.012

Авторы:

Леонова Г.Н., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории природноочаговых трансмиссивных инфекций ФГБНУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, г. Владивосток, Россия;

Майстровская О.С., младший научный сотрудник лаборатории природноочаговых трансмиссивных инфекций ФГБНУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, г. Владивосток, Россия;

Лубова В.А., младший научный сотрудник лаборатории природноочаговых трансмиссивных инфекций ФГБНУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, г. Владивосток, Россия;

Санина Н.М., д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник Дальневосточного федерального университета, г. Владивосток, Россия.

Authors:

Leonova G.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Head Researcher, Laboratory of Natural Focal Transmissible Infections, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russian Federation;

Majstrovskaya O.S., Junior Researcher, Laboratory of Natural Focal Transmissible Infections, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russian Federation;

Lubova V.A., Junior Researcher, Laboratory of Natural Focal Transmissible Infections, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russian Federation;

Sanina N.M., PhD, MD (Biology), Professor, Leading Researcher, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation.

Поступила в редакцию 19.11.2018
Отправлена на доработку 09.04.2019
Принята к печати 30.04.2019

Received 19.11.2018
Revision received 09.04.2019
Accepted 30.04.2019

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ СИСТЕМЫ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ МЕДИЦИНСКОЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Т.Ф. Степанова¹, А.П. Ребещенко¹, И.В. Бакштановская¹, В.В. Мазуркевич²

¹ ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия

² ГБУЗ ТО Областное бюро судебно-медицинской экспертизы, г. Тюмень, Россия

Резюме. Работники медицинских организаций являются контингентами высокого риска заражения инфекционными болезнями, вызываемыми условно-патогенными и патогенными микроорганизмами. В структуре профессиональных заболеваний медицинских работников Российской Федерации первое ранговое место занимает туберкулез органов дыхания, на долю которого приходится более половины всех регистрируемых профессиональных заболеваний. Особенно высокая заболеваемость отмечается среди персонала работников бюро судебно-медицинской экспертизы и противотуберкулезных учреждений. Организация эпидемиологического надзора и профилактика туберкулеза среди персонала медицинских учреждений до настоящего времени остается не решенной проблемой как в научном, так и в практическом отношении. Одной из причин высокой заболеваемости туберкулезом можно назвать то, что в структуре клинических форм туберкулеза стало больше пациентов, страдающих распространенными, запущенными и осложненными формами, выделяющих лекарственно-устойчивые микобактерии туберкулеза, а также ростом социально значимых сочетанных инфекций (ВИЧ+туберкулез) среди населения. Объектом исследования являлось Тюменское областное бюро судебно-медицинской экспертизы (ТО БСМЭ), где за период с 2009 по 2018 гг. было отобрано и исследовано молекулярно-генетическими методами 4948 смывов (2009–2013 гг. — 3649; 2014–2018 гг. — 1299), взятых с различных объектов окружающей среды, рук и спецодежды сотрудников во время выполнения ими производственных процессов в секционных залах, лабораториях и помещениях административно-хозяйственной части. ДНК микобактерий туберкулеза обнаружена в 353 смывах в 2009–2013 гг. и в 81 смыве за период с 2014 по 2018 гг. С учетом степени контакта с патогенными биологическими агентами (ПБА) медицинские технологии, реализуемые в ТО БСМЭ, были разделены на две группы. Проведена оценка контаминации микобактериями отделений медицинской организации и отдельных объектов, а также оценен риск контаминации рук и спецодежды персонала в соответствии с его профессиональными обязанностями; установлены статистически достоверные различия сравниваемых групп. Показаны отделения и объекты внешней среды, подверженные наиболее высокой угрозе контаминации микобактериями, которые участвуют в распространении возбудителей туберкулеза из секционных залов в другие подразделения бюро. Идентификация этих объектов позволила администрации повысить результативность процессов, обеспечивающих эпидемиологическую безопасность персонала, что привело не только к достоверному снижению частоты находок ДНК микобактерий

Адрес для переписки:

Ребещенко Анна Петровна
625026, Россия, г. Тюмень, ул. Республики, 147,
Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии.
Тел.: 8 (3452) 28-99-92; 8 912 399-37-30 (моб.).
E-mail: rebeschenkoAP@Tniikip.rosпотребнадзор.ru

Contacts:

Anna P. Rebeshchenko
625026, Russian Federation, Tyumen, Respubliki str., 147,
Tyumen Region Infection Pathology Research Institute.
Phone: +7 (3452) 28-99-92; +7 912 399-37-30 (mobile).
E-mail: rebeschenkoAP@Tniikip.rosпотребнадзор.ru

Библиографическое описание:

Степанова Т.Ф., Ребещенко А.П., Бакштановская И.В., Мазуркевич В.В.
Оценка эффективности системы обеспечения эпидемиологической
безопасности медицинской организации // Инфекция и иммунитет.
2019. Т. 9, № 3–4. С. 568–576. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-568-576

Citation:

Stepanova T.F., Bakshtanovskaya I.V., Rebeshchenko A.P., Mazurkevich V.V.
Assessing efficiency of epidemiological security system for the medical
organization // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya
i immunitet, 2019, vol. 9, no. 3–4, pp. 568–576. doi: 10.15789/2220-7619-
2019-3-4-568-576

рий на рабочих поверхностях, руках, спецодежде персонала, но и сопровождалось снижением заболеваемости сотрудников бюро туберкулезом с 292,4–280,9 случаев на 10 тыс. работающих в 2007–2009 гг., до 46,3 случаев в 2017–2018 гг.

Ключевые слова: нозокомиальный туберкулез, эпидемиологическая безопасность медицинской деятельности, микобактерии, молекулярно-генетические исследования, медицинские работники.

ASSESSING EFFICIENCY OF EPIDEMIOLOGICAL SECURITY SYSTEM FOR THE MEDICAL ORGANIZATION

Stepanova T.F.^a, Bakshtanovskaya I.V.^a, Rebeshchenko A.P.^a, Mazurkevich V.V.^b

^a Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation

^b Regional Bureau of Forensic Medicine, Tyumen, Russian Federation

Abstract. Healthcare workers comprise a high-risk cohort of developing diverse infections caused by opportunistic and pathogenic microbes. Among medical workers of the Russian Federation the first rank place in occupational diseases is held by tuberculosis of respiratory organs accounting for more than half of all registered occupational diseases. Moreover, its high incidence is particularly noted among forensic specialists and medical workers in anti-tuberculosis institutions. The organization of epidemiological surveillance and tuberculosis prevention medical workers so far remains unsolved both scientifically and practically. On one hand, high TB incidence in pattern of clinical TB forms may be due to higher percentage of patients suffering from common, advanced and complicated forms of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* infection as well as rise of socially significant co-infections (HIV+tuberculosis) among the population. Specialists from the Regional Bureau of Forensic Medicine were examined during 2009–2018 time period by using molecular genetic approaches to analyze 4948 wash samples (2009–2013 — 3649 samples; 2014–2018 — 1299 swabs) collected from various environmental objects, medical overalls and hands of medical specialists while performing professional duties in autopsy rooms, laboratories as well as facilities housekeeping department. It was demonstrated that *M. tuberculosis* DNA was detected in 353 and 81 swabs in 2009–2013 and 2014–2018 time period. Based on intensity of contacting with pathogenic biological agents, production technologies applied in the Regional Bureau of Forensic Medicine were divided into two groups. *M. tuberculosis* contamination in diverse facilities or any item as well as a contamination risk for medical worker hands and medical overalls were evaluated in accordance with professional duties assigned to individual specialists, followed by calculating significant differences in groups examined. It was found that some facilities and environmental items most exposed to a high-risk *M. tuberculosis* contamination were identified, which are involved in pathogen spreading from autopsy rooms outside to the remainder of facilities. It allowed for authorities to improve performance of activities ensuring epidemiological security for attending specialists that not only resulted in significantly decreased incidence of *M. tuberculosis* DNA detection, but also lowered TB incidence rate among them from 292.4 down to 280.9 cases and 46.3 per 10 thousand workers during 2007–2009 and 2017–2018 time period, respectively.

Key words: nosocomial tuberculosis, medical personnel, molecular-genetic researches, mycobacteria, epidemiological safety of medical activity.

Введение

Медицинский персонал является группой профессионального риска по заболеваемости инфекциями, вызываемыми как патогенными, так и условно-патогенными микроорганизмами. По данным эпидемиологических исследований, уровень заболеваемости этого контингента острыми и хроническими инфекционными заболеваниями превышает аналогичную заболеваемость взрослого населения при отдельных нозологических формах в десятки раз [13, 15, 16]. В последние годы среди медицинских работников ежегодно регистрируется более 200 случаев профессиональных заболеваний. Уровень профессиональной заболеваемости медиков сегодня сопоставим с заболеваемостью работников, занятых на предприятиях металлургии, машиностроения и судостроения,

строительной индустрии, сельского хозяйства, транспорта, по добыче полезных ископаемых, по производству строительных материалов [15].

Ключевая роль среди факторов производственной среды, повлекших возникновение профессиональных заболеваний у работников здравоохранения, принадлежит биологическому фактору (в 2017 г. — 57,3%), а основным заболеванием, связанным с воздействием биологического фактора, является туберкулез органов дыхания — более 80% ежегодно (в 2017 г. — 80,26%) [8, 15].

Одной из причин высокой заболеваемости нозокомиальным туберкулезом медицинских работников можно назвать изменение структуры заболевших: стало больше пациентов, страдающих распространенными, запущенными и осложненными формами. Около четверти новых случаев туберкулеза — мультилекарствен-

ноустойчивые формы, и такое же количество новых случаев этого заболевания диагностируется у ВИЧ-инфицированных [1, 5, 6, 10, 14].

Организация эпидемиологического надзора и профилактика туберкулеза среди медицинских работников в настоящее время являются не решенной проблемой как в научном, так и в практическом отношении. Современная нормативная база, регламентирующая организацию эпидемиологического надзора за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи, в основном ориентирована на контроль инфекций в акушерских стационарах и стационарах (отделениях) хирургического профиля, нуждается в пересмотре [7, 9, 12]. Сотрудниками ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора были разработаны методические рекомендации, основанные на комплексном подходе к организации условий труда и обеспечивающие эпидемиологическую безопасность персонала бюро судебно-медицинской экспертизы [11].

Сотрудниками ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора были разработаны мероприятия, обеспечивающие эпидемиологическую безопасность персонала бюро судебно-медицинской экспертизы, основанные на комплексном подходе к организации условий труда, исключающих заражение туберкулезной инфекцией [11].

Эпидемиологическая безопасность подразумевает управление факторами риска биологической природы с целью снижения их отрицательного влияния на здоровье персонала и складывается из нескольких составляющих компонентов [2, 4, 15, 17]:

- эпидемиологической безопасности медицинских технологий;
- эпидемиологической безопасности больницы;
- эффективного микробиологического мониторинга;
- эпидемиологической диагностики.

Медицинские технологии — использование одноразовых расходных материалов и изделий; современные методы дезинфекции и стерилизации, учитывающие этиологическую структуру возбудителя, характерную для каждого типа стационара.

Эпидемиологическая безопасность больницы определяется низкой микробной обсемененностью объектов внешней среды, отсутствием циркуляции микобактерий, минимизацией риска распространения возбудителей туберкулеза из секционных залов в другие подразделения и др. Эти условия обеспечиваются целым рядом факторов в различных сферах деятельности медицинской организации — организацией поточности производственных про-

цессов, эффективной дезинфекцией, микробиологически чистым воздухом, достаточной площадью и объемом помещений, безопасным удалением медицинских отходов.

Важнейшим компонентом для осуществления эпидемиологической безопасности является обеспечение эффективного микробиологического мониторинга. Данный вид мониторинга в наших исследованиях осуществляется с помощью молекулярно-генетических исследований смывов, отбираемых с поверхностей и объектов (контрольных точек), его цель — оценка частоты встречаемости ДНК микобактерий туберкулеза (ДНК МБТ) в смывах.

Ключевым моментом анализа итогов надзора и/или мониторинга за результативностью мероприятий по обеспечению безопасности труда персонала бюро судебно-медицинской экспертизы служит процедура формирования эпидемиологического диагноза о причинах недостаточной продуктивности мер, направленных на минимизацию активности эпидемического процесса. Если причины не установлены, то результативность профилактики профессионального заражения сотрудников бюро возбудителями инфекционных заболеваний, в первую очередь МБТ, будет недостаточной.

Целью исследования явилось оценка эффективности системы обеспечения эпидемиологической безопасности, которая включала комплекс мероприятий (диагностических, санитарно-противоэпидемических и др.), направленных на создание безопасной производственной среды и предотвращение случаев нозокомиального туберкулеза среди персонала бюро судебно-медицинской экспертизы г. Тюмени.

Материалы и методы

Объектом исследования являлось Тюменское областное бюро судебно-медицинской экспертизы, в состав которого входят следующие структурные подразделения: отделение судебно-медицинской экспертизы трупов; отделение судебно-медицинской экспертизы потерпевших, обвиняемых и других лиц; судебно-биологическое отделение; судебно-химическое отделение; судебно-биохимическое отделение; медико-криминалистическое отделение; отдел сложных экспертиз и организационно-методический отдел.

За период с 2009 по 2018 гг. было отобрано и исследовано молекулярно-генетическими методами 4948 смывов (2009–2013 гг. — 3649; 2014–2018 гг. — 1299), взятых с различных объектов рабочей среды, рук и спецодежды сотрудников во время выполнения ими производственных процессов в секционных залах, лабораториях

и помещениях административно-хозяйственной части (АХЧ). ДНК микобактерий туберкулеза обнаружена в 353 смывах в 2009–2013 гг. и в 81 смыве за период с 2014 по 2018 гг.

Статистическая обработка выполнена лицензионным программным обеспечением SPSS, версия 22.0. В исследовании использовались дискретные показатели. Дискретные данные анализировались с помощью таблиц сопряженности, которые применялись для расчета относительного риска или отношения шансов встречаемости исследуемого явления в анализируемых группах. Первый из этих критериев выражается отношением встречаемости явления в контрольной группе по сравнению с группой наблюдения. Второй определяется как отношение вероятности того, что анализируемое явление произойдет, к вероятности того, что оно не произойдет. Гипотеза о равенстве относительного риска и шансов встречаемости отвергается, когда величина соответствующего критерия не равна 1, а его 95% доверительные интервалы не включают в себя 1. Статистически значимыми считали различия при достигнутом $p > 0,05$.

Результаты

В исследование были включены результаты эпидемиологического наблюдения за период с 2009 по 2018 гг. В 2009–2013 гг. бюро судебно-медицинской экспертизы осуществляло деятельность в старом здании, санитарно-техническое состояние которого не соответствовало гигиеническим требованиям, предъявляемым к этим медицинским организациям. Неудовлетворительные условия труда, по мнению некоторых исследователей, занимают первое место среди причин, способствующих высокой заболеваемости туберкулезом медицинских работников [3, 11, 12].

В 2014 г. было введено в эксплуатацию новое здание бюро, при строительстве которого применялись современные архитектурно-планировочные решения, обеспечивающие точность производственных процессов, достаточ-

ные площади и необходимый набор помещений (комнаты для приема пищи, гардеробные, санпропускники и прочие), а также эффективные системы очистки и дезинфекции воздуха.

Еще одним фактором, который учитывался при проведении исследования, являлся контакт с патогенными биологическими агентами (ПБА). Особенностью деятельности медицинских работников бюро судебно-медицинской экспертизы является ежедневная работа с ПБА, к которым относятся, согласно СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», кровь и другие биологические жидкости организма, подозрительные на содержание патогенных для человека возбудителей инфекционных заболеваний. Все медицинские технологии реализуемые в ТО БСМЭ были разделены на две группы. Первая группа — с повышенным риском биологической угрозы — это отделение судебно-медицинской экспертизы трупов (отделение СМЭ трупов), сотрудники которого участвовали в процессе вскрытия трупов в секционных залах, то есть имели высокую степень контакта с ПБА.

Во вторую группу вошли сотрудники отделения судебно-медицинской экспертизы живых лиц (отделение СМЭ живых лиц), лабораторных подразделений и административно-хозяйственного отдела (АХО), которые в процессе своей работы не имели высокой степени контакта с ПБА.

С помощью таблицы сопряженности мы сравнили частоту встречаемости роста бактерий в смывах, отобранных с рук, спецодежды и обуви персонала, а также с поверхностями внешней среды. Результаты расчетов представлены в таблице 1.

Из данных таблицы 1 следует, что процент «МБТ-положительных» смывов сократился с 9,7% в 2009–2013 гг. до 6,2% в 2014–2018 гг. Оценку достоверности имеющихся различий мы провели с помощью критерия хи-квадрат (χ^2), а после этого измерили относительный

Таблица 1. Частота встречаемости туберкулезных бактерий в смывах

Table 1. Frequency of tuberculous bacteria detection in swabs

Статистика Statistical method	Периоды контроля Time period	Результат Data		Всего Total
		Есть ДНК микобактерий Mycobacteria DNA	Нет ДНК микобактерий No mycobacteria DNA	
% в периоды контроля % time period	2009–2013 гг.	9,7%	90,3%	100%
	2014–2018 гг.	6,2%	93,8%	100%
	Всего Total	8,8%	91,2%	100%
Скорректированный остаток Adjusted residual	2009–2013 гг.	3,8	–3,8	
	2014–2018 гг.	–3,8	3,8	

риск встречаемости микобактерий в 2009–2013 гг., по сравнению с 2014–2018 гг., и рассчитали для него 95% доверительные интервалы. Значимость χ^2 2-сторонняя значительно меньше 0,001, следовательно, с достоверностью 99,9% можно утверждать, что в 2009–2013 гг. частота идентификации микобактерий в смывах была выше, чем за последние четыре года. При этом относительный риск встретить ДНК МБТ в 2009–2013 гг. был в 1,6 раза выше, чем в 2014–2018 гг. С учетом доверительных интервалов величина этого показателя колебалась от 1,25 до 2,07 раз (OR 1,61 и 95% CI 1,25–2,07).

Далее проведена сравнительная оценка интенсивности контаминации микобактериями туберкулеза в отделении судебно-медицинской экспертизы трупов, лабораториях и АХО ТО БСМЭ, то есть в группах с разной степенью контакта с патогенными биологическими агентами.

Из представленной таблицы 2 видно, что встречаемость смывов, в которых обнаружена ДНК МБТ, в отделении судебно-медицинской экспертизы трупов выше, чем в других подразделениях бюро.

Частота обнаружения микобактерий в смывах, отобранных в отделении СМЭ трупов, достоверно сократилась с 21,4 до 14,1% ($\chi^2 = 12, 273$, $p = 0,000$), а в других подразделениях медицинской организации — с 3,7 до 1,1% ($\chi^2 = 13, 366$, $p = 0,000$) в 2014–2018 гг. по сравнению с 2009–2013 гг. соответственно. Расчет отношения шансов и относительного риска встречаемости показал, что риск встретить ДНК МБТ в смывах с поверхностей помещений, спецодежды и рук сотрудников отделения СМЭ трупов в 2009–2013 гг. был выше в 1,6 раза (OR 1,65 и 95% CI 1,24–2,20), а в лабора-

ториях и прочих подразделениях — в 3,3 раза (OR 3,36 и 95% CI 1,68–6,71). Таким образом, по сравнению с группам подразделений, произошло достоверное снижение угрозы контаминации микобактериями за последние четыре года, по сравнению с 2014–2018 гг.

Следующий этап исследования включал данные мониторинга, полученные при отборе смывов в отделении СМЭ трупов, где реализуются процессы с повышенным риском биологической угрозы. Результаты анализов помогли изучить механизм распространения МБТ внутри отделения и измерить его активность.

При сравнении частоты контаминации предметов окружающей среды и персонала отмечено статистически значимое снижение в 2014–2018 гг. по сравнению с предшествующим периодом частоты идентификации микобактерий с контрольных точек рабочих помещений бюро ($\chi^2 = 10, 91$, $p = 0,001$), где относительный риск встретить МБТ в 1,6 раза ниже, чем в 2009–2013 гг. (OR 1,68 и 95% CI 1,23–2,31) (табл. 2). У персонала отделения достоверных различий не выявлено. Это лишнее подтверждает, что работа в секционном зале сопряжена с интенсивным бактериальным обсеменением рук и спецодежды сотрудников.

Самый высокий уровень контаминации МБТ отмечался в секционных залах (37,2 и 26,6%); далее идут бытовые помещения для санитаров (20,9 и 19,0%), кабинеты экспертов (11,9 и 2,8%) и помещения для лаборантов (8,5 и 3,4%) в 2009–2013 гг. и 2014–2018 гг. соответственно.

При стратификации результатов молекулярно-генетических исследований смывов в 2009–

Таблица 2. Частота встречаемости туберкулезных бактерий в смывах в разрезе подразделений

Table 2. Facility-related frequency of tuberculous bacteria detection in swabs

Статистика Statistical method	Отделения Facilities	Периоды контроля Time period	Результат Data		Всего Total
			Есть ДНК МБТ Mycobacteria DNA	Нет ДНК МБТ No Mycobacteria DNA	
% в периоды контроля % time period	Отделение СМЭ трупов Facility of forensic medical examination	2009–2013 гг.	21,4%	78,6%	100%
		2014–2018 гг.	14,1%	85,9%	100%
		Всего Total	19,3%	80,7%	100%
	Прочие подразделения Other facilities	2009–2013 гг.	3,7%	96,3%	100%
		2014–2018 гг.	1,1%	98,9%	100%
		Всего Total	3,1%	96,9%	100%
Скорректированный остаток Adjusted residual	Отделение СМЭ трупов Facility of forensic medical examination	2009–2013 гг.	3,5	–3,5	
		2014–2018 гг.	–3,5	3,5	
	Прочие подразделения Other facilities	2009–2013 гг.	3,7	–3,7	
		2014–2018 гг.	–3,7	3,7	

Таблица 3. Частота встречаемости туберкулезных бактерий в смывах с персонала и предметов окружающей среды

Table 3. Frequency of tuberculous bacteria detection in swabs collected from personnel and environmental items

Статистика Statistical method	Группы контроля Monitoring group	Периоды контроля Time period	Результат Result		Всего Total
			Есть ДНК МБТ Mycobacteria DNA	Нет ДНК МБТ No Mycobacteria DNA	
% в периоды контроля % time period	Персонал Personnel	2009–2013 гг.	9,2%	90,8%	100%
		2014–2018 гг.	6,5%	93,5%	100%
		Всего Total	8,5%	91,5%	100%
	Предметы окружающей среды Environmental items	2009–2013 гг.	9,9%	90,1%	100%
		2014–2018 гг.	6,1%	93,9%	100%
		Всего Total	8,9%	91,1%	100%
Скорректированный остаток Adjusted residual	Персонал Personnel	2009–2013 гг.	1,8	-1,8	
		2014–2018 гг.	-1,8	1,8	
	Предметы окружающей среды Environmental items	2009–2013 гг.	3,3	-3,3	

2013 гг. по контрольным точкам установлено, что наиболее высокий уровень контаминации МБТ отмечался на уборочном инвентаре, далее в убывающем порядке располагались медицинское оборудование, прочие предметы, спецодежда и обувь, водопроводные краны и дверные ручки. За период 2014–2018 гг. произошло снижение контаминации практически на всех исследуемых поверхностях.

Установлено, что у медицинских работников с высшим и средним образованием скорректированный остаток превышал +2 или -2, это позволяет с достоверностью в 95% утверждать, что данная категория персонала достоверно отличалась от других по частоте обнаружения

МБТ. Стабильно высокий уровень микробного загрязнения рук, спецодежды и обуви установлен у санитаров — 26,0 и 25,9%.

Аналогичным способом проведен анализ результатов молекулярно-генетических исследований смывов на индикацию микобактерий, полученных в отделении СМЭ живых лиц, лабораториях и АХО.

Из данных таблицы 4 следует, что частота встречаемости ДНК МБТ в смывах, отобранных с объектов производственной среды и персонала других отделений ТО БСМЭ, в 2014–2018 гг. сократилась: в судебно-химическом отделении — с 5,7 до 0,8%; в судебно-гистологическом — с 5,3 до 2,3%; в медико-кримина-

Таблица 4. Частота встречаемости туберкулезных бактерий в смывах с персонала и предметов окружающей среды

Table 4. Frequency of tuberculous bacteria detection in swabs collected from personnel and environmental items

Статистика Statistical method	Группы контроля Monitoring group	Периоды контроля Time period	Результат Result		Всего Total
			Есть ДНК МБТ Mycobacteria DNA	Нет ДНК МБТ No mycobacteria DNA	
% в периоды контроля % time period	Персонал Personnel	2009–2013 гг.	3,6%	96,4%	100%
		2014–2018 гг.	0,7%	99,3%	100%
		Всего Total	2,9%	97,1%	100%
	Предметы окружающей среды Environmental items	2009–2013 гг.	3,7%	96,3%	100%
		2014–2018 гг.	1,4%	98,6%	100%
		Всего Total	3,2%	96,8%	100%
Скорректированный остаток Adjusted residual	Персонал Personnel	2009–2013 гг.	2,5	-2,5	
		2014–2018 гг.	-2,5	2,5	
	Предметы окружающей среды Environmental items	2009–2013 гг.	2,6	-2,6	
		2014–2018 гг.	-2,6	2,6	

листическом — с 4,3 до 2,3%; в судебно-биологическом — с 3,9 до 0,7%; в АХО — с 2,2 до 0%; в судебно-биохимическом отделении — с 1,1 до 0%. Судя по скорректированному остатку, достоверное снижение угрозы отмечалось в судебно-химическом отделении.

За период контроля с 2009 по 2013 гг. у персонала и на объектах окружающей среды уровень контаминации возбудителем туберкулеза был одинаков — 3,6 и 3,7% соответственно. Достоверное снижение контаминации произошло в 2014–2018, по сравнению с 2009–2013 гг., как у сотрудников ($\chi^2 = 6,336$, $p = 0,012$), так и на объектах окружающей среды ($\chi^2 = 7,002$, $p = 0,008$). При этом относительный риск встретить ДНК МБТ в смывах в 2009–2013 гг. у персонала был выше в 5 раз (OR 5,23 и 95% CI 1,24–22,06), а с контрольных точек в 2,7 раза выше (OR 2,78 и 95% CI 1,26–6,12), чем в 2014–2018 гг.

Результаты исследований смывов в 2009–2013 гг. по контрольным точкам аналогичны результатам, полученным в отделении СМЭ трупов. В лабораторных подразделениях наиболее высокий уровень контаминации МБТ отмечался на уборочном инвентаре (степень загрязнения МБТ не изменилась и составила 25,0%, то есть каждый четвертый смыв дает положительный результат), далее в убывающем порядке располагались медицинское оборудование, руки сотрудников, спецодежда и обувь, вентиляционные решетки, водопроводные краны и дверные ручки. За период с 2014 по 2018 гг. произошло снижение контаминации на медицинском оборудовании с 6,8 до 2,3%, на руках сотрудников с 5,3 до 0%, со спецодежды и обуви с 3,1 до 0,9%, с прочих предметов с 3,1 до 0,6%, с вентиляционных решеток с 2,5 до 1,4%, с дверных ручек с 2,5 до 0%. Незначительный рост находок был установлен на водопроводных кранах с 2,6 до 3,4%.

Несмотря на то что вышеуказанные отделения относятся к группе с низкой степенью контакта с ПБА, здесь реализуется тот же ме-

ханизм распространения микобактерий, как и в отделении СМЭ трупов: при вскрытии трупов людей, при жизни имевших проявления инфекционных заболеваний, механизм передачи заразного начала меняется вследствие изменения естественного способа на искусственный. Несоблюдение правил антисептики при реализации процессов, имеющих повышенный риск биологической угрозы, заведет к массивной микробной контаминации рабочей среды и сотрудников посредством контактного пути передачи.

Фактором заражения сотрудников туберкулезом является степень их контакта с трупами или секционным материалом в секционном зале: в отделении СМЭ трупов зарегистрирована половина случаев заболевания туберкулезом, 19,5% — в судебно-биологической лаборатории, 11,5% — в АХО, по 7,7% — в судебно-гистологической и судебно-химической лаборатории, 3,8% — в медико-криминалистической. Наиболее интенсивно эпидемический процесс реализовался среди среднего медицинского персонала учреждения, их доля в структуре заболевших туберкулезом составила 42,3%, далее идут судебно-медицинские эксперты — 26,9%, санитары — 19,2% и сотрудники АХО — 11,5%.

С 2007 г. ежегодно заболевало от 1 до 5 сотрудников, что составляло, в пересчете на 10 000 работающих, от 292,4 до 46,3 случаев. В отдельные годы показатели заболеваемости в несколько раз превышали заболеваемость взрослого населения города (рис.).

Результаты исследования показали какие отделения и объекты были подвержены наиболее высокой угрозе контаминации микобактериями. Именно они участвуют в распространении возбудителей туберкулеза из секционных залов в другие подразделения ТО БСМЭ. Идентификация этих объектов позволила администрации медицинской организации повысить результативность процессов, обеспечивающих биологическую безопасность персонала, что

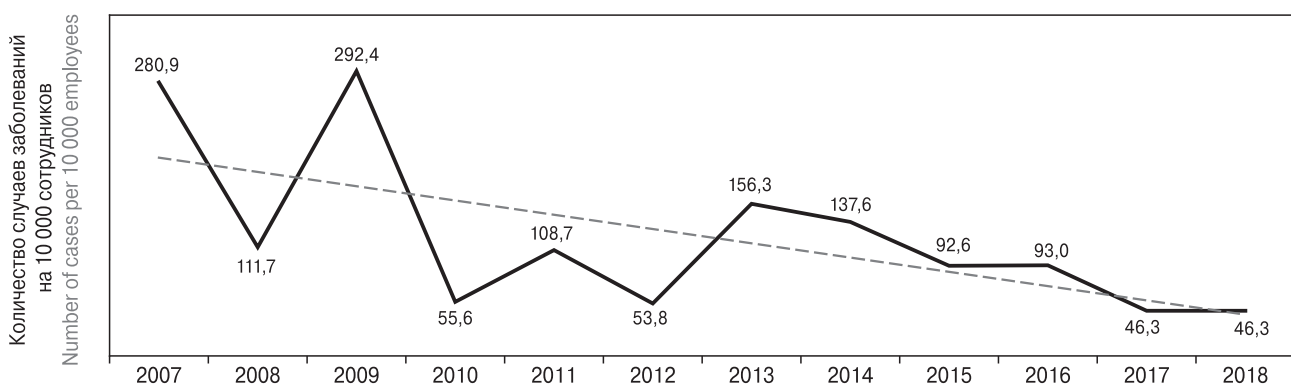


Рисунок. Динамика и уровни заболеваемости туберкулезом сотрудников

Figure. Dynamics and levels of tuberculosis incidence among employees

привело не только к достоверному снижению частоты находок ДНК микобактерий на объектах окружающей среды, руках, спецодежде персонала, но и сопровождалось снижением заболеваемости сотрудников бюро туберкулезом. Разработанные в ФБУН ТНИИКИП рекомендации по созданию и использованию системы управления эпидемиологической безопасностью труда персонала бюро судебно-медицинс-

кой экспертизы, направленной на повышение результативности профилактики нозокомиального распространения туберкулеза среди сотрудников, доказали свою эффективность и могут быть рекомендованы для использования. С помощью этой системы в рамках производственного контроля возможно оперативно выявлять и устранять причины, способствующие возникновению профессиональных заболеваний.

Список литературы/References

1. Алексеева Т.В., Ревякина О.В., Филиппова О.П., Краснов В.А. Туберкулез в Сибирском и Дальневосточном федеральных округах (2007–2016 гг.) // Туберкулез и болезни легких. 2017. Т. 95, № 8. С. 12–17. [Alekseeva T.V., Revyakina O.V., Filippova O.P., Krasnov V.A. Tuberculosis in Siberian and Far Eastern Federal Districts (2007–2016). *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2017, vol. 95, no. 8, pp. 12–17. (In Russ.)]
2. Брико Н.И., Брусина Е.Б., Зуева Л.П., Ковалишева О.В., Стасенко В.Л., Фельдблюм И.В., Шкарин В.В. Стратегия обеспечения эпидемиологической безопасности медицинской деятельности // Вестник Росздравнадзора. 2017. № 4. С. 15–21. [Briko N.I., Brusina E.B., Zueva L.P., Kovalishena O.V., Stasenko V.L., Feldblum I.V., Shkarin V.V. The strategy of ensuring epidemiological safety of medical activity. *Vestnik Roszdravnadzora = Roszdravnadzor bulletin*, 2017, no. 4, pp. 15–21. (In Russ.)]
3. Бектасова М.В., Капцов В.А., Шепарев А.А. Приоритетные направления оздоровления медицинских работников фтизиатрической службы Приморского края // Гигиена труда. 2012. № 2. С. 26–29. [Bektasova M.V., Kaptsov V.A., Sheparev A.A. Priorities for health improvement in the medical workers of phthisiatric service in the Primorye territory. *Gigiiena truda = Hygiene and Sanitation*, 2012, no. 2, pp. 26–29. (In Russ.)]
4. Вахрушева Д.В., Еремеева Н.И., Канищев В.В., Белоусова К.В., Умпелева Т.В., Федорова Л.С., Лавренчук Л.С. Рекомендации по выбору дезинфицирующих средств, эффективных в отношении *Mycobacterium tuberculosis* // Фтизиатрия и пульмонология. 2017. Т. 16, № 3. С. 88–103. [Eremeeva N.I., Kanichev V.V., Vakhrusheva D.V., Belousova K.V., Umpeleva T.V., Fedorova L.S., Lavrechuk L.S. Guidelines for choice of effective disinfectants against *Mycobacterium tuberculosis*. *Ftiziatriya i pul'monologiya = Phthisiology and Pulmonology*, 2017, vol. 16, no. 3, pp. 88–103. (In Russ.)]
5. Васильева И.А., Белilloвский Е.М., Борисов С.Е., Стерликов С.А. Заболеваемость, смертность и распространенность как показатели бремени туберкулеза в регионах ВОЗ, странах мира и в Российской Федерации. Часть 2. Смертность от туберкулеза // Туберкулез и болезни легких. 2017. Т. 95, № 7. С. 8–15. [Vasilyeva I.A., Belilovsky E.M., Borisov S.E., Sterlikov S.A. Incidence, mortality and prevalence as indicators of tuberculosis burden in WHO regions, countries of the world and the Russian Federation. Part 2. Tuberculosis mortality. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2017, vol. 95, no. 8, pp. 8–15. (In Russ.)]
6. Герасимов А.Н., Михеева И.В. Эпидемиологическая ситуация с туберкулезом в России – кажущееся благополучие и скрытые угрозы // Тихоокеанский медицинский журнал. 2018. № 3. С. 75–78. [Gerasimov A.N., Mikheeva I.V. The epidemiological situation with tuberculosis in Russia – an apparent well-being and hidden threats. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2018, no. 3, pp. 75–78. (In Russ.)]
7. Данцев В.В., Карпущенко В.Г., Спицын М.Г., Мучаидзе Р.Д., Колосовская Е.Н., Кузин А.А., Шитов Ю.Н. Профилактика заноса и распространения туберкулеза среди пациентов и персонала многопрофильной военно-медицинской организации // Медицинский альянс. 2016. № 4. С. 20–24. [Dantsev V.V., Karpuschenko V.G., Spitsyn M.G., Muchaidze R.D., Kolosovskaya E.N., Kuzin A.A., Shitov Ju.N. Prevention of introduction and spread of tuberculosis among patients and personal in multifield military medical establishments. *Meditsinskiy al'yans = Medical Alliance*, 2016, no. 4, pp. 20–24. (In Russ.)]
8. Еремеева Н.И., Вахрушева Д.В., Кравченко М.А., Канищев В.В., Умпелева Т.В., Белоусова К.В., Голубева Л.А., Шарипова М.В. Мониторинг контаминации производственной среды лечебного учреждения возбудителем туберкулеза // Фтизиатрия и пульмонология. 2016. Т. 12, № 1. С. 102–119. [Eremeeva N.I., Vakhrusheva D.V., Kravchenko M.A., Kanischev V.V., Umpeleva T.V., Belousova K.V., Golubeva L.A., Sharapova M.V. Monitoring of MBT contamination of environment of health organization. *Ftiziatriya i pul'monologiya = Phthisiology and Pulmonology*, 2016, vol. 12, no. 1, pp. 102–119. (In Russ.)]
9. Зорина М.М., Петренко Т.И., Филимонов П.Н. Оценка влияния мер инфекционного контроля на динамику заболеваемости туберкулезом персонала противотуберкулезных медицинских организаций // Туберкулез и болезни легких. 2017. Т. 95, № 8. С. 30–34. [Zorina M.M., Petrenko T.I., Filimonov P.N. Assessment of infection control impact on changes in TB incidence among workers of TB medical units. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2017, vol. 95, no. 8, pp. 30–34. (In Russ.)]
10. Корецкая Н.М., Большакова И.А. Характеристика первичной лекарственной устойчивости и жизнеспособности микобактерий у больных туберкулезом в сочетании с ВИЧ-инфекцией // Туберкулез и болезни легких. 2017. Т. 95, № 2. С. 16–20. [Koretskaya N.M., Bolshakova I.A. Typical features of primary drug resistance and viability of mycobacteria in tuberculosis patients with concurrent HIV infection. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2017, vol. 95, no. 2, pp. 16–20. (In Russ.)]
11. Корначев А.С., Степанова Т.Ф., Бакштановская И.В., Брагина Е.А., Кальгина Г.А., Катаева Л.В., Адлер Ю.П. Организация мониторинга биологической безопасности труда персонала бюро судебно-медицинской экспертизы и патологоанатомических отделений, в части профилактики внутрибольничного заражения туберкулезом //

- Фтизиатрия и пульмонология. 2012. № 2 (5). С. 76–177. [Kornachev A.S., Stepanova T.F., Bakshantovskaja I.V., Bragina E.A., Kalgina G.A., Kataeva L.V., Adler U.P. Organization of monitoring of biological safety of personnel of the Bureau of forensic medical examination and pathoanatomical departments, in terms of prevention of nosocomial tuberculosis infection. *Fitziatriya i pul'monologiya = Phthisiology and Pulmonology*, 2012, no. 2 (5), pp. 76–177. (In Russ.)]
12. Мясникова Е.Б., Сагиева Н.Р., Журавлев В.Ю., Яблонский П.К. Нозокомиальная туберкулезная инфекция — обоснование концепции эпидемиологической диагностики // Медицинский альянс. 2014. № 1. С. 6–19. [Myasnikova E.B., Sagieva N.R., Jouravlev V.Yu., Yablonskii P.K. Nosocomial TB infection — need in epidemiologic diagnosis concept. *Meditsinskiy al'yans = Medical Alliance*, 2014, no. 1, pp. 6–19. (In Russ.)]
 13. Нафеев А.А., Мерцалова С.Л., Посеряев А.В., Сибрякова Р.Н., Нафеев Н.А. Профессиональное заражение туберкулезом медицинских работников // Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины. 2014. Т. 22, № 5. С. 20–22. [Nafeev A.A., Mertsalova S.L., Poseriaev A.V., Sibiriakova R.N., Nafeev N.A. The profession contamination of medical personnel with tuberculosis. *Problemy sotsial'noy gigieny, zdravookhraneniya i istorii meditsiny = Public Health and History of Medicine*, 2014, vol. 22, no. 5, pp. 20–22. (In Russ.)]
 14. Нечаев В.В., Иванов А.К., Яковлев А.А., Мусатов В.Б., Федуняк О.И., Васильева М.В., Беляков В.С., Кравцова А.И. Эпидемиология социально значимых сочетанных инфекций. Факторы риска летальных исходов // Тихоокеанский медицинский журнал. 2018. № 3. С. 68–71. [Nechaev V.V., Ivanov A.K., Yakovlev A.A., Musatov V.B., Fedunyak O.I., Vasilieva M.V., Belyakov V.S., Kravtsova A.I. Epidemiology of socially significant co-infections. Risk factors for deaths. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2018, no. 3, pp. 68–71. (In Russ.)]
 15. Попова А.Ю. Эпидемиологическая безопасность — неотъемлемый компонент системы обеспечения качества и безопасности медицинской помощи // Вестник Росздравнадзора. 2017. № 4. С. 5–8. [Popova A.YU. Epidemiological safety — an integral component of the system to ensure medical care quality and safety. *Vestnik Roszdravnadzora = Roszdravnadzor Bulletin*, 2017, no. 4, pp. 5–8. (In Russ.)]
 16. Сазук А.В., Акимкин В.Г., Чернявская О.П. Состояние профессиональной заболеваемости туберкулезом работников здравоохранения в Российской Федерации // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2009. Т. 48, № 1. С. 6–10. [Sacuk A.V., Akimkin V.G., Chernjavskaja O.P. Status of professional tuberculosis incidence of health workers in Russia. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccination*, 2009, vol. 48, no. 1, pp. 6–10. (In Russ.)]
 17. Сармометов Е.В., Сергевнин В.И., Микова О.Е., Зимина В.Н., Варецкая Т.А., Шмагин Д.В. Частота контаминации микобактериями туберкулеза производственной среды медицинской организации, оказывающей помощь пациентам с ВИЧ-инфекцией // Медицина в Кузбассе. 2015. Т. 14, № 4. С. 40–44. [Sarmometov E.V., Sergevnnin V.I., Mikova O.E., Zimina V.N., Varetskaya T.A., Shmagin D.V. The frequency of mycobacteria tuberculosis contamination of working environment in medical organization providing care for patients with HIV infection. *Meditsina v Kuzbasse = Medicine in Kuzbass*, 2015, vol. 14, no. 4, pp. 40–44. (In Russ.)]

Авторы:

Степанова Т.Ф., д.м.н., профессор, директор ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия;

Бакштановская И.В., к.б.н., ученый секретарь ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия;

Ребещенко А.П., младший научный сотрудник лаборатории эпидемиологического анализа и математического моделирования ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия;

Мазуркевич В.В., к.м.н., начальник ГБУЗ ТО Областное бюро судебно-медицинской экспертизы, г. Тюмень, Россия.

Authors:

Stepanova T.F., PhD, MD (Medicine), Professor, Director of Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation;

Bakshantovskaya I.V., PhD (Biological), Academic Council Secretary of Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation;

Rebeshchenko A.P., Junior Researcher, Laboratory of Epidemiological Analysis and Mathematical Modeling, Tyumen, Russian Federation;

Mazurkevich V.V., PhD (Medicine), Director of Regional Bureau of Forensic Medicine, Tyumen, Russian Federation.

Поступила в редакцию 06.03.2019
Отправлена на доработку 18.03.2019
Принята к печати 22.03.2019

Received 06.03.2019
Revision received 18.03.2019
Accepted 22.03.2019

ХРОНИЧЕСКИЙ ГЕПАТИТ В БЕЗ И С ДЕЛЬТА-АГЕНТОМ В КЫРГЫЗСТАНЕ (ЭПИДЕМИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ, КЛИНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ)

К.А. Ногойбаева¹, С.Т. Тобокалова¹, Д.С. Бекенова¹, Ж.Н. Назарбаева²

¹ Кыргызский государственный медицинский институт переподготовки и повышения квалификации, Бишкек, Кыргызская Республика

² Медицинский центр «Цадмир», г. Ош, Кыргызская Республика

Резюме. Цель: изучение эпидемической, клинической и лабораторной характеристик хронических вирусных гепатитов В без дельта-агента (ХВГВ) и с дельта-агентом (ХВГВ+D) в сравнительном аспекте. *Материалы и методы.* Изучена государственная отчетная форма № 12 за период с 2010 по 2017 гг. Проанализированы 133 истории болезни больных ХВГВ и 130 — ХВГВ+D. Обработка материала была проведена в программе Microsoft Office Excel. *Результаты и обсуждение.* В период с 2010 по 2017 гг. уровень регистрации носительства HBV (60,4 ‰) был в 20 раз выше регистрации ХВГВ [3,8 ‰, 95% ДИ (2,4–4,0)] и ХВГВ+D [3,4 ‰, 95% ДИ (2,2–3,4)], так как абсолютное большинство пациентов после выявления HBsAg детально не обследовались, а в ПМСП им эмпирически диагностировали носительство HBV. В результате были пересмотрены стандартные определения случая указанных состояний и, в соответствии с рекомендациям ВОЗ, разработана усовершенствованная система эпиднадзора за вирусными гепатитами от 2016 г. и утвержденная приказом МЗ КР № 524 от 20.07.2018 г. Астения наблюдалась у 60% пациентов обеих групп. Артралгия встречалась у 5–10% больных, чаще при ХВГВ+D, тогда как на миалгию жаловались только у 3% пациентов. На нарушение функции ЦНС в виде головных болей и беспокойного сна одинаково часто жаловались у 10–15% больных, при этом не было статистически значимой разницы в сравниваемых группах. У больных с ХВГВ+D достоверно преобладали диспепсические проявления в виде плохого аппетита (72±3,9% и 20,6±3,5%, p < 0,05), тошноты (23,8±3,7% и 7,3±2,3%, p < 0,05), рвоты (12,3±2,6% и 3,3±1,5%, p < 0,05) и метеоризма (27±3,9% и 13±2,9%, p < 0,05). Боли в правом подреберье беспокоили 52–56% больных, без статистически значимой разницы в наблюдаемых группах. Желтушность склер и кожи в 2–3 раза, а кожный зуд в 8 раз чаще выявлялись у больных ХВГВ+D. Более выраженный цитолиз и признаки нарушения обмена билирубина также чаще встречались у больных HBV с дельта-агентом. Таким образом, более тяжелое течение ХВГВ+D требует обязательного обследования всех пациентов при первичном выявлении HBsAg и на антитела к HDV, для раннего выявления и своевременной организации вторичной и третичной профилактики в стране.

Ключевые слова: заболеваемость, клиника, лабораторные показатели, вирусная нагрузка, хронический вирусный гепатит В, хронический вирусный гепатит В с дельта-агентом, Кыргызстан.

Адрес для переписки:

Ногойбаева Калысбубу Асанбековна
720040, Кыргызская Республика, Бишкек, ул. Боконбаева, 144а,
Кыргызский ГМИ переподготовки и повышения квалификации
им. С.Б. Даниярова.
Тел.: +996 (312) 65-26-48 (служебн.); +996 550-63-58-64 (моб.).
E-mail: k.nogoibaeva2014@gmail.com

Contacts:

Kalys A. Nogoibaeva
720040, Kyrgyz Republic, Bishkek, Bokonbaeva str., 144a,
Kyrgyz State Medical Institute for Advanced Training and Retraining.
Phone: +996 (312) 65-26-48 (office); +996 550-63-58-64 (mobile).
E-mail: k.nogoibaeva2014@gmail.com

Библиографическое описание:

Ногойбаева К.А., Тобокалова С.Т., Бекенова Д.С., Назарбаева Ж.Н.
Хронический гепатит В без и с дельта-агентом в Кыргызстане
(эпидемическая ситуация, клинические особенности) // Инфекция
и иммунитет. 2019. Т. 9, № 3–4. С. 577–582. doi: 10.15789/2220-7619-
2019-3-4-577-582

Citation:

Nogoibaeva K.A., Tobokalova S.T., Bekenova D.S., Nazarbaeva J.N.
Chronic hepatitis B associated without/with a delta agent in Kyrgyzstan
(epidemiological situation, clinical features) // Russian Journal of Infection
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 3–4, pp. 577–582.
doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-577-582

CHRONIC HEPATITIS B ASSOCIATED WITHOUT/WITH A DELTA AGENT IN KYRGYZSTAN (EPIDEMIOLOGICAL SITUATION, CLINICAL FEATURES)

Nогойбаева К.А.^a, Тобокалова С.Т.^a, Бекенова Д.С.^a, Назарбаева Ж.Н.^b

^a *Kyrgyz State Medical Institute for Advanced Training and Retraining, Bishkek, Kyrgyz Republic*

^b *Medical Center "Tsadmir", Osh, Kyrgyz Republic*

Abstract. *Objective.* To compare epidemiological, clinical and laboratory characteristics of chronic hepatitis B (ChHB) associated with/without delta agent (ChHB+DV) study. *Materials and methods.* The Kyrgyzstan State Reporting Form No. 12 covering 2010–2017 period was examined. For this, 133 and 130 case histories of ChHB and ChHB+DV patients, respectively, were analyzed. The data were statistically processed by using Microsoft Office Excel software. *Results and discussion.* Over the 2010–2017 period, prevalence of the "HBV Carrier" (60.4 ‰) was higher by 20-fold than that one for ChHB [3.8 ‰, 95% CI (2.4–4.0)] and CVHD [3.4 ‰, 95% CI (2.2–3.4)], as the vast majority of patients were not thoroughly examined after detecting HBsAg, and the HBV Carrier was empirically diagnosed at the primary health care units. As a result, routine case definitions for such conditions were revised and an improved system of epidemiological surveillance of viral hepatitis was developed, according to the 2016 WHO recommendations approved by the Ministry of Health of the Kyrgyz Republic (Order No. 524, dated of July 20, 2018). Asthenia was observed in ~60% of patients in both groups, whereas arthralgia — in ~5–10% of patients, more often in those comorbid with ChHB+DV, and myalgia — in as low as ~3% of cases. Impaired central nervous system functions manifested as headache and restless sleep were evenly recorded in about 10–15% of patients, without significant difference between groups. In contrast, dominating dyspeptic manifestations such as poor appetite (72±3.9% vs. 20.6±3.5%, $p < 0,05$), nausea (23.8±3.7% vs. 7.3±2.3%, $p < 0,05$), vomiting (12.3±2.6% vs. 3.3±1.5%, $p < 0,05$) and flatulence (27±3.9% and 13±2.9%, $p < 0,05$) were revealed in ChHB+DV patients. Pain in the right hypochondrium was noted in 52–56% of patients, insignificantly differed between patient groups. Incidence of yellowness of the sclera and skin layers as well as skin itching were recorded by 2–3 and 8 times, respectively, more frequently in ChHB+DV patients. A more profound cytolysis and signs of altered bilirubin metabolism were also more common in HBV patients comorbid with the delta agent. Thus, a more severe ChHB+DV course requires that all patients with primary HBsAg detection were mandatorily examined for anti-HDV antibodies to ensure early diagnostics and timely organization of the secondary and tertiary preventive measures in the Kyrgyzstan.

Key words: morbidity, clinic, laboratory parameters, viral load, chronic hepatitis B, chronic hepatitis B with delta agent, Kyrgyzstan.

Введение

По утверждению Генерального директора ВОЗ Маргарет Чен: «Мир, на свою беду, давно оставляет проблему гепатита без внимания. Пришло время мобилизовать силы для глобальных ответных действий по борьбе с гепатитом в том же масштабе, в котором это было сделано в отношении других инфекционных заболеваний, таких как ВИЧ/СПИД и туберкулез». Согласно оценкам ВОЗ, 2 млрд человек имеют признаки HBV-инфекции, 240 млн человек живут с хроническим гепатитом В (ХГВ), до 30% случаев которого завершаются развитием осложнений в виде цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы [9]. К более быстрому прогрессированию болезни до стадии цирроза и рака печени приводит суперинфекция дельта-агентом, которая встречается у 5% носителей HBsAg [12]. Неполный охват вакцинацией против гепатита В из-за отказа населения от прививок в силу разных причин обуславливает заболеваемость острыми вирусными гепатитами как среди взрослых, так и среди детей, особенно в странах с неблагоприятной эпидемиологической ситуацией [7, 10]. Возможность перинатальной передачи HBV на фоне неполного охвата вакцинацией новорожденных является основной причиной высокой распространенности хронических вирусных гепатитов В без (ХВГВ) и с дель-

та-агентом (ХВГВ+D) [12, 13, 14]. Увеличение летальных случаев от цирроза печени в исходе вирусных гепатитов требует выявления каждого пациента с ХВГВ и ХВГВ+D для обеспечения мер вторичной и третичной профилактики [4, 11].

В Кыргызской Республике (КР) вакцинация против гепатита В проводится в рамках Национального календаря прививок с 1999 г. Но, несмотря на успешную реализацию программы вакцинации детей, продолжается регистрация острых случаев болезни в связи с отказом родителей и медотводами от вакцинации [5]. Система эпиднадзора за ХВГВ и ХВГВ+D, внедренная в 2010 г., ежегодно выявляет случаи болезни во всех областях страны, независимо от возраста [2]. Число пациентов, нуждающихся в трансплантации печени из-за цирроза в исходе хронического вирусного гепатита, растет с каждым годом [6].

Целью исследования явилось изучение эпидемиологической ситуации ХВГВ и ХВГВ+D за последние 7 лет, клинической и лабораторной характеристик этих заболеваний в сравнительном аспекте.

Материалы и методы

Была изучена государственная отчетная форма № 12 «Отчет о заболеваемости и профилактической работе (центра семейной медицины, диспансера)», в которой регистрируются первично

выявленные на уровне организаций первичной медико-санитарной помощи (ПМСП) пациенты с ХВГВ и ХВГВ+D (B18.0 и B18.1 по МКБ 10 соответственно). Был проведен анализ базы данных указанного отчета, аккумулированных в Центре электронного здравоохранения Министерства здравоохранения Кыргызской Республики (ЦЭЗ МЗ КР) за период с 2010 по 2017 гг. Расчет показателя заболеваемости производился на 100 тыс. населения, для чего была использована база данных по численности населения Национального комитета статистики КР. Для определения его 95% доверительного интервала был использован онлайн-калькулятор “Binomial Confidence Intervals” [8]. В расчете стандартной ошибки пропорции (удельный вес изучаемого признака) использована формула:

$$\sqrt{p \frac{(1-p)}{n}}$$

Так как p выражался в процентах, то $(1-p)$ заменен на $(100-p)$. 95% доверительный интервал для пропорции оценивался по формуле:

$$\left(p - \left[1,96 \times \sqrt{p \frac{(1-p)}{n}} \right]; p + \left[1,96 \times \sqrt{p \frac{(1-p)}{n}} \right] \right),$$

а для средних значений по формуле:

$$\bar{x} - (1,96 \times SEM); \bar{x} + (1,96 \times SEM) \quad (SEM = m) \quad [1].$$

Вероятность безошибочного прогноза (p) определяется по t -критерию достоверности Стьюдента.

Проанализировано 133 и 130 историй болезни больных ХВГВ и ХВГВ+D соответственно. Пациенты наблюдались в гепатологических центрах городов Бишкек и Ош за период с 2013 по 2016 гг. Верификация диагноза проводилась на основании серологических (обнаружение

HBsAg, HBeAg, anti-HDV методом ИФА), молекулярных (ПЦР), биохимических (исследования общего состояния и функций печени) и клинических данных. Обработка материала была проведена с использованием статистического пакета компьютерной программы Microsoft Office Excel.

Результаты

В КР с 2010 по 2017 гг. в государственную отчетную форму № 12 «Отчет о заболеваемости и профилактической работе (центра семейной медицины, диспансера)» было включено 3292 больных хроническим вирусным гепатитом В. У 1738 пациентов имел место ХВГВ, а у 1554 — ХВГВ+D. При этом заболеваемость указанными формами не имела статистически значимой разницы (3,8 ‰, 95% ДИ (2,4–4,0) и 3,4 ‰, 95% ДИ (2,2–3,4), ХВГВ и ХВГВ+D соответственно) (рис.). В динамике уровень выявляемости ХВГВ стабильно держался в пределах 2,6–3,1 ‰, с периодическими подъемами до 6,7 ‰, а уровень заболеваемости ХВГВ+D достоверно снизился в 6,7 раза (с 4,0 ‰ [95% ДИ (2,4–4,0)] до 0,6 ‰ [95% ДИ (0,635–0,636)], 2010 и 2017 гг. соответственно). Данные, представленные на рисунке, показывают, что в КР выявляемость ХВГВ и ХВГВ+D в 20 раз ниже, чем носительства HBV (60,4 ‰).

Анализ половозрастной структуры наблюдаемых больных показал, что ХВГВ чаще наблюдался у женщин (60,9±4,2% [95% ДИ (52,6–69,2)]) и 39,1±4,2% [95% ДИ (30,8–47,4)], $p < 0,05$, женщины и мужчины соответственно), а ХВГВ+D — у мужчин (36,4±4,2% [95% ДИ (28,1–44,7)]) и 63,4±4,2% [95% ДИ (55,1–71,7)], $p < 0,05$, женщины и мужчины, соответственно). Среди пациентов с ХВГВ и ХВГВ+D преоблада-

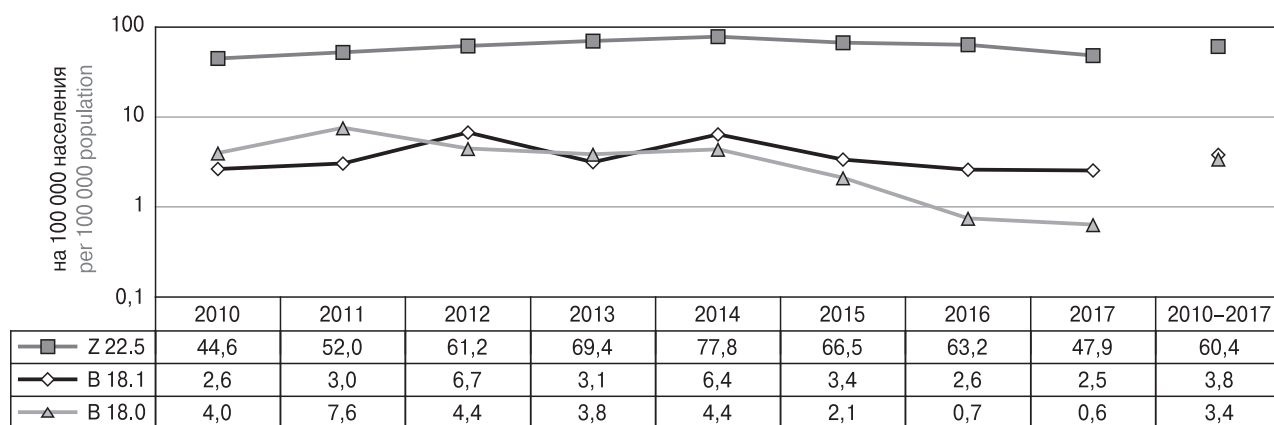


Рисунок. Динамика заболеваемости хронического вирусного гепатита В с (B18.0), без дельта-агента (B18.1) и носительства HBV (Z22.5) в возрастном аспекте, Кыргызстан, 2010–2017 гг. Государственная отчетная форма № 12 «Отчет о заболеваемости и профилактической работе (центра семейной медицины, диспансера)»

Figure. The dynamics of incidence of chronic viral hepatitis B associated with (B18.0), without the delta agent (B18.1) and carriage of HBV (Z22.5) in diverse age groups, Kyrgyzstan, 2010–2017. State Reporting Form No. 12 “Report on morbidity and preventive work (family medicine center, dispensary)”

дали лица молодого (18–29 лет) и среднего (30–45 лет) возраста — 80,5±3,4% пациентов с ХВГВ [95% ДИ (73,8–87,2)] и 73,9±3,6% — с ХВГВ+D [95% ДИ (66,4–81,4)]. Лица ≥ 46 лет обращались значительно реже (19,5±3,4% [95% ДИ (12,8–26,2)] и 26,1±3,9% [95% ДИ (18,6–33,7)], ХВГВ и ХВГВ+D соответственно).

Сравнительная клиническая характеристика изучаемых групп пациентов представлена в таблице 1. Из общеинтоксикационных проявлений гепатита астения встречалась приблизительно у 60% наблюдаемых пациентов обеих групп. Артралгия отмечена у ≈ 5–10% больных, чаще при ХВГВ+D (5,7±2,0% [95% ДИ (1,8–9,6)] и 11,9±2,8% [95% ДИ (6,3–17,5)], $p < 0,05$, ХВГВ и ХВГВ+D соответственно), тогда как на миалгию жаловались только около 3% пациентов. На нарушения со стороны ЦНС в виде головных болей и беспокойного сна одинаково часто жаловались около 10–15% больных, при этом не было статистически значимой разницы в сравниваемых группах. У больных с ХВГВ+D достоверно превалировали диспепсические проявления в виде плохого аппетита (20,6±3,5% и 72±3,9%, $p < 0,05$, ХВГВ и ХВГВ+D соответственно), тошноты (7,3±2,3% и 23,8±3,7%, $p < 0,05$, ХВГВ и ХВГВ+D соответственно), рвоты (3,3±1,5%

и 12,3±2,6%, $p < 0,05$, ХВГВ и ХВГВ+D соответственно) и метеоризма (13±2,9% и 27±3,9%, $p < 0,05$, ХВГВ и ХВГВ+D соответственно). Боли в правом подреберье беспокоили 52–56% больных, без статистически значимой разницы в наблюдаемых группах. Желтушность склер (13,8±3% и 47,6±4,4%, $p < 0,05$, ХВГВ и ХВГВ+D соответственно) и кожи (13,8±3% и 30,1±4,0%, $p < 0,05$, ХВГВ и ХВГВ+D соответственно) в 2–3 раза чаще выявлялись у больных ХВГВ+D, а кожный зуд — в 8 раз чаще (1,6±1,1% и 12,6±2,9%, $p < 0,05$, ХВГВ и ХВГВ+D соответственно). Лабораторные исследования функции печени показали наличие более выраженного цитолиза (АЛТ — 0,33±0,04 мккат/л и 0,63±0,06 мккат/л, $p < 0,05$, ХВГВ и ХВГВ+D соответственно) и признаков нарушения обмена билирубина (общий билирубин — 40,4±0,6 мкмоль/л и 69,8±0,4 мкмоль/л, $p < 0,05$, ХВГВ и ХВГВ+D соответственно) у больных ХВГВ+D (табл. 2). У каждого второго пациента уровень вирусной нагрузки достигал 10 000 копий/мл (49,2±4,3% [95% ДИ (40,7–57,7)]). Такой же уровень вирусной нагрузки зарегистрирован у 90% больных ХВГВ+D (91,2±2,5% [95% ДИ (86,4–96,0)]). Около 40% пациентов с ХВГВ имели вирусную нагрузку в пределах 10–100 млн копий/мл (38,6±4,2% [95% ДИ (30,3–46,9)]).

Таблица 1. Сравнительная характеристика семиотики больных ХВГВ и ХВГВ+D, Кыргызстан, 2013–2016 гг.

Table 1. Comparative semiotics characteristics of patients with chronic hepatitis B without (ChHB) and with the delta agent (ChHB+DV), 2013–2016, Kyrgyzstan

Симптомы Symptoms	ХВГВ, n = 133 ChHB, n = 133		ХВГВ+D, n = 130 ChHB+DV, n = 130		P
	%±m	95% ДИ, 95% CI	%±m	95% ДИ 95% CI	
Общеинтоксикационные проявления/Manifestations of general intoxication syndrome					
Астения/Asthenia	58,9±4,2	50,5–67,3	63,6±4,2	55,3–71,9	> 0,05
Артралгия/Arthralgia	5,7±2,0	1,8–9,6	11,9±2,8	6,3–17,5	< 0,05
Миалгия/Myalgia	3,3±1,5	0,6–2,9	3,4±1,6	0,3–6,5	> 0,05
Нарушение функции ЦНС/CNS dysfunction					
Головные боли/Headaches	9,3±2,5	4,4–14,2	15,6±3,1	9,4–21,8	> 0,05
Беспокойный сон/Restless sleep	2,7±1,4	0,1–5,4	10,5±2,6	5,2–15,8	> 0,05
Нарушение функции ЖКТ/Gastrointestinal dysfunction					
Плохой аппетит/Reduced appetite	20,6±3,5	13,7–27,5	72±3,9	64,3–79,7	< 0,05
Тошнота/Nausea	7,3±2,3	2,9–11,7	23,8±3,7	16,5–31,2	< 0,05
Рвота/Vomiting	3,3±1,5	0,3–6,3	12,3±2,6	6,7–18,0	< 0,05
Боли в правом подреберье Pain in the right hypochondrium	52,0±4,3	43,5–60,5	56,6±4,4	48,1–65,1	> 0,05
Метеоризм Flatulence	13±2,9	7,3–18,7	27±3,9	19,4–34,6	< 0,05
Нарушение пигментного обмена/Disruption of pigment metabolism					
Желтушность склер Icteric sclera	13,8±3	7,9–19,7	47,6±4,4	39,0–56,2	< 0,05
Желтушность кожи Skin jaundice	13,8±3	5,1–15,5	30,1±4,0	22,2–38,0	< 0,05
Кожный зуд Pruritus	1,6±1,1	0,5–3,7	12,6±2,9	6,9–18,3	< 0,05

Обсуждение

При длительном изучении на местах причины высокого уровня носительства HBV по сравнению с ХВГВ и ХВГВ+D, было установлено, что абсолютное большинство пациентов после выявления HBsAg не обращались к специалисту, не обследовались, а в ПМСП им эмпирически ставили диагноз «Носительство HBV». Выявленная ситуация потребовала пересмотра стандартов определения случаев указанных состояний и разработки усовершенствованной системы эпиднадзора за вирусными гепатитами согласно рекомендациям ВОЗ от 2016 г. Также Приказом МЗ КР № 524 от 20.07.2018 г. было утверждено «Руководство по эпидемиологическому надзору за вирусными гепатитами в Кыргызской Республике» [3].

У больных ХВГВ+D клинико-лабораторные признаки нарушения пищеварительной функции и пигментного обмена были более выражены по сравнению с больными ХВГВ, что подтверждалось статистически. Это было свя-

зано с более глубоким поражением печени при ХВГВ+D. Большой размах показателей вирусной нагрузки объясняется тем, что 80,5±3,4% наблюдаемых больных являлись лицами молодого и среднего возраста, для которых характерна иммунная толерантная фаза гепатита. Наличие высокой вирусной нагрузки HDV на фоне относительно низкого уровня HBV является показателем подавления репликации вируса гепатита В дельта-агентом и косвенным критерием тяжести у наблюдаемых больных ХВГВ+D.

Таким образом, в КР ожидается, что усовершенствованная система эпиднадзора за ХВГВ и ХВГВ+D, позволит специалистам ПМСП своевременно выявлять пациентов с парентеральными вирусными гепатитами. Более тяжелое течение ХВГВ+D требует обязательного обследования всех пациентов с первично выявленным носительством HBsAg на антитела к HDV для раннего обнаружения ХВГВ+D и своевременной организации вторичной и третичной профилактики в стране.

Таблица 2. Сравнительная характеристика лабораторных показателей больных ХВГВ и ХВГВ+D, Кыргызстан, 2013–2016 гг.

Table 2. Comparing laboratory parameters of patients with chronic hepatitis B without (ChHB) and with the delta agent (ChHB+DV), 2013–2016 Kyrgyzstan

Результаты Parameters	ХВГВ, n = 133 ChHB, n = 133		ХВГВ+D, n = 130 ChHB+DV, n = 130		P
	M±m	95% ДИ/95% CI	M±m	95% ДИ/95% CI	
Функция печени/Liver function					
АЛТ, мккат/л ALT, mkat/l	0,33±0,04	0,25–0,41	0,63±0,06	0,51–0,75	< 0,05
АСТ, мккат/л AST, mkat/l	0,44±0,05	0,34–0,54	0,52±0,09	0,34–0,70	> 0,05
Тимоловая проба, ед Thymol test, units	6,3±0,3	5,7–6,9	9,8±0,8	8,2–11,4	< 0,05
Общий билирубин, мкмоль/л Total bilirubin, mkmol/l	40,4±0,6	39,2–41,6	69,8±0,4	69,0–70,6	< 0,05
Прямой билирубин, мкмоль/л Direct bilirubin, mkmol/l	29,8±0,4	29,0–30,6	40,5±0,9	38,7–42,3	< 0,05
Общий белок, г/л Total protein, g/l	74,2±3,6	67,1–81,3	72,6±5,9	61,0–84,2	> 0,05
Альбумин, % Albumin, %	39,1±2,4	34,4–43,8	36,4±4,6	27,4–45,4	> 0,05
Вирусная нагрузка (ПЦР)/Viral load (PCR)					
	%±m	95% ДИ 95% CI	%±m	95% ДИ 95% CI	P
ДНК HBV, копий/мл DNA HBV, copies/ml					
< 10 ⁴	49,2±4,3	40,7–57,7	91,2±2,5	86,4–96,0	< 0,05
10 ⁵	6,5±2,1	2,3–10,7	8,8±2,5	4,0–13,6	> 0,05
10 ⁶ –10 ⁷	38,6±4,2	30,3–46,9			
10 ⁹ –10 ¹⁰	5,7±2,0	1,8–9,6			
РНК HDV, копий/мл RNA HBV, copies/ml					
10 ⁵ –10 ⁷	–		36,2±4,2	27,9–44,5	
10 ⁹ –10 ¹⁰	–		54±4,2	55,5–72,0	

Список литературы/References

1. Зайцев В.М., Лифляндский В.Г., Маринкин В.И. Прикладная медицинская статистика. СПб.: Фолиант, 2003. 240 с. [Zaitsev V.M., Livlyandsky V.G., Marinkin V.I. Applied medical statistics. SPb.: Foliant, 2003. 240 p. (In Russ.)]
2. Ногойбаева К.А., Тобокалова С.Т., Касымбекова К.Т., Заирова Г.М. Возрастная подверженность к хроническому вирусному гепатиту дельта по областям // Наука, новые технологии и инновации Кыргызстана. 2015. № 5. С. 68–71. [Nogoibaeva K.A., Tobokalova S.T., Kasymbekova K.T., Zairova G.M. Age susceptibility to chronic viral hepatitis delta in regions of Kyrgyzstan. *Nauka, novye tehnologii i innovacii Kyrgyzstana = Science, New Technologies and Innovations in Kyrgyzstan*, 2015, no. 5, pp. 68–71. (In Russ.)]
3. Руководство по эпидемиологическому надзору за вирусными гепатитами в КР. Утв. Приказом МЗ КР № 524 от 20.07.18 г. [Guidelines on epidemiological surveillance of viral hepatitis in the Kyrgyz Republic. Approved by order of the Ministry of Health of the Kyrgyz Republic No. 524 dated 07.20.18]. Available at: <http://www.npopm.kg/uploads/media/default/0001/01/a25faf33d1eb741276df336fe629d9453b1ed32c.pdf> (26.08.19)
4. Силачева М.В., Грищенко Е.Г., Петрова М.М., Николаева Н.Н., Байкова О.А., Николаева Л.В. Цирроз печени и рак желудка: современное состояние проблемы // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 3. С. 187. [Silacheva M.V., Grischenko E.G., Petrova M.M., Nikolaeva N.N., Baykova O.A., Nikolaeva L.V. Cirrhosis and gastric cancer: current state of problem. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2015, no. 3, p. 187. (In Russ.)]
5. Тобокалова С.Т., Бекенова Д.С., Заирова Г.М., Нурматов З.Ш., Назарбаева Ж.Н., Айтиева Ж.Т. Эпидемиологические особенности острого и хронического гепатитов В в Кыргызской Республике за 20-летний период (1997–2017 гг.) // Казанский медицинский журнал. 2018. Т. 99, № 6. С. 986–993. [Tobokalova S.T., Bekenova D.S., Zairova G.M., Nurmatov Z.Sh., Nazarbaeva Zh.N., Aytieva Zh.T. Epidemiological features of acute and chronic hepatitis B in the Kyrgyz Republic over the 20-year period (1997–2017). *Kazanskij medicinskij zhurnal = Kazan Medical Journal*, 2018, vol. 99, no. 6, pp. 986–993. doi: 10.17816/KMJ2018-986 (In Russ.)]
6. Тобокалова С.Т., Заирова Г.М., Бекенова Д.С., Ногойбаева К.А. Проблемы цирроза в исходе хронических вирусных гепатитов в Кыргызстане // Вестник Кыргызско-Российского славянского университета. 2016. Т. 16, № 3. С. 134–137. [Tobokalova S.T., Zairova G.M., Bekenova D.S., Nogoibaeva K.A. Problems of liver cirrhosis in the origin of chronic viral hepatitis in Kyrgyzstan. *Vestnik Kyrgyzsko-Rossijskogo slavjanskogo universiteta = Bulletin of the Kyrgyz-Russian Slavic University*, 2016, vol. 16, no. 3, pp. 134–137. (In Russ.)]
7. Chien Y.C., Jan C.F., Chiang C.J., Kuo H.S., You S.L., Chen C.J. Incomplete hepatitis B immunization, maternal carrier status, and increased risk of liver diseases: a 20-year cohort study of 3,8 million vaccines. *Hepatology*, 2014, vol. 60, no. 1, pp. 125–132. doi: 10.1002/hep.27048
8. Exact Binomial and Poisson Confidence Intervals. URL: <http://statpages.info/confint.html> (26.08.19)
9. Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B virus infection. Geneva: WHO, 2015.
10. Iqbal K., Kleven R.M., Kainer M.A., Baumgartner J., Gerard K., Poissant T., Sweet K., Vonderwahl C., Knickerbocker T., Khudyakov Y., Xia G.L., Roberts H., Teshale E. Epidemiology of acute hepatitis B in the united states from population-based surveillance, 2006–2011. *Clin. Infect. Dis.*, 2015, vol. 61, pp. 584–592. doi: 10.1093/cid/civ332
11. Lin J., Wu J.-F., Zhang Q. Virus-related liver cirrhosis: molecular basis and therapeutic option. *World J. Gastroenterol.*, 2014, vol. 7, no. 20 (21), pp. 6457–6469.
12. Nouredin M., Gish R. Hepatitis Delta: epidemiology, diagnosis and management 36 years after discovery. *Curr. Gastroenterol. Rep.*, 2014, vol. 16: 365. doi: 10.1007/s11894-013-0365-x
13. Ott J.J., Horn J., Krause G., Mikolajczyk R.T. Time trends of chronic HBV infection over prior decades. A global analysis. *J. Hepatol.*, 2017, vol. 66, pp. 48–54. doi: 10.1016/j.jhep.2016.08.013
14. Stanaway J.D., Flaxman A.D., Naghavi M., Fitzmaurice C., Vos T., Abubakar I., Abu-Raddad L.J., Assadi R., Bhala N., Cowie B., Forouzanfar M.H., Groeger J., Hanafiah K.M., Jacobsen K.H., James S.L., MacLachlan J., Malekzadeh R., Martin N.K., Mokdad A.A., Mokdad A.H., Murray C.J.L., Plass D., Rana S., Rein D.B., Richardus J.H., Sanabria J., Saylan M., Shahrz S., So S., Vlassov V.V., Weiderpass E., Wiersma S.T., Younis M., Yu C., El Sayed Zaki M., Cooke G.S. The global burden of viral hepatitis from 1990 to 2013: findings from the global burden disease study 2013. *Lancet*, 2016, vol. 388, pp. 1081–1088. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30579-7

Авторы:

Ногойбаева К.А., к.м.н., доцент кафедры инфекционных болезней, ВИЧ/СПИД и дерматовенерологии, КГМИ переподготовки и повышения квалификации, Бишкек, Кыргызская Республика;
Тобокалова С.Т., зав. кафедрой инфекционных болезней, ВИЧ/СПИД и дерматовенерологии КГМИ переподготовки и повышения квалификации, Бишкек, Кыргызская Республика;
Бекенова Д.С., доцент кафедры инфекционных болезней, ВИЧ/СПИД и дерматовенерологии, КГМИ переподготовки и повышения квалификации, Бишкек, Кыргызская Республика;
Назарбаева Ж.Н., врач-гепатолог Медицинского центра «ЦАДМИР», г. Ош, Кыргызская Республика.

Authors:

Nogoibaeva K.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Infectious Diseases, HIV/AIDS and Dermatovenerology, Kyrgyz State Medical Institute for Advanced Training and Retraining, Bishkek, Kyrgyz Republic;
Tobokalova S.T., Head of the Department of Infectious Diseases, HIV/AIDS and Dermatovenerology, Kyrgyz State Medical Institute for Advanced Training and Retraining, Bishkek, Kyrgyz Republic;
Bekenova D.S., Associate Professor, Department of Infectious Diseases, HIV/AIDS and Dermatovenerology, Kyrgyz State Medical Institute for Advanced Training and Retraining, Bishkek, Kyrgyz Republic;
Nazarbaeva J.N., Hepatologist, Medical Center “Tsadmir”, Osh, Kyrgyz Republic.

Поступила в редакцию 02.11.2018
 Отправлена на доработку 13.03.2019
 Принята к печати 09.04.2019

Received 02.11.2018
 Revision received 13.03.2019
 Accepted 09.04.2019

ОЦЕНКА И ПРОГНОЗ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ОРВИ-ГРИППОМ С ПОМОЩЬЮ МАТЕМАТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ SIR+A НА ТЕРРИТОРИИ МОСКВЫ В 2016 ГОДУ

Н.А. Контаров^{1,2}, Г.В. Архарова¹, Ю.Б. Гришунина³, С.А. Гришунина^{3,4},
Н.В. Юминова²

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

² ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

³ Московский институт электроники и математики им. А.Н. Тихонова Национального исследовательского университета «Высшая школа экономики», Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Резюме. Из-за высокой трансмиссивности и способности вызывать крупные эпидемии, грипп представляет собой серьезную проблему для мирового здравоохранения. Эпидемии и пандемии гриппа связаны с изменениями в структуре общества, которые способствуют распространению новых штаммов в конкретных экологических и социальных условиях. В настоящее время грипп является одним из самых распространенных заболеваний в мире. Ежегодно он вызывает эпидемии или даже пандемии, нередко приводя к летальному исходу. Уникальная способность вирусов гриппа к изменчивости путем точечных мутаций, рекомбинаций и реассортации генов, сопровождающаяся изменением биологических свойств вируса — основная причина неконтролируемого распространения инфекции. В связи с этим изучение популяции восприимчивых индивидуумов с использованием вероятностных моделей не только дает дополнительную информацию о вспышке, но и позволяет отслеживать динамику эпидемии на контролируемых территориях. Понимание эпидемиологии гриппа имеет решающее значение в распределении ресурсов здравоохранения. Основой мерой общественного здравоохранения в борьбе с вирусом является вакцинация. Однако существуют уязвимые группы населения, такие как пожилые люди и лица с ослабленным иммунитетом, которые, как правило, не обладают защитным уровнем антител к вирусу гриппа. Несмотря на успехи в создании вакцин и средств химиотерапии, эпидемии гриппа по-прежнему имеют огромные масштабы. При этом достоверные способы прогноза заболеваемости с учетом скорости развития эпидемической ситуации на сегодняшний день отсутствуют. Отслеживание и прогнозирование возникающих эпидемий затруднено из-за несоответствия между динамикой эпидемии, которую можно анализировать по данным эпиднадзора, и системой отслеживания числа заболевших гриппом. Наличие мутаций у вируса гриппа усугубляют данную ситуацию, изменяя истинную динамику заболеваемости. Использование вероятностных моделей для оценки параметров стохастической эпидемии будет способствовать более точному прогнозу изменения заболеваемости. В настоящей работе с целью прогноза изменения заболеваемости используется вероятностная модель, учитывающая взаимосвязь между инфицированными, восприимчивыми и невосприимчивыми индивидуумами, а также агрессивностью внеш-

Адрес для переписки:

Контаров Николай Александрович
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а,
ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.
Тел.: 8 (495) 674-01-99.
E-mail: kontarov@mail.ru

Contacts:

Nikolay A. Kontarov
105064, Russia, Moscow, Small Kazenny Lane, 5a,
I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera.
Phone: +7 (495) 674-01-99.
E-mail: kontarov@mail.ru

Библиографическое описание:

Контаров Н.А., Архарова Г.В., Гришунина Ю.Б., Гришунина С.А., Юминова Н.В. Оценка и прогноз заболеваемости ОРВИ-гриппом с помощью математической модели SIR+A на территории Москвы в 2016 году // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 3–4. С. 583–588. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-583-588

Citation:

Kontarov N.A., Arkharova G.V., Grishunina Yu.B., Grishunina S.A., Yuminova N.V. SIR+A mathematical model for evaluating and predicting 2016–2017 ARVI-influenza incidence by using on the Moscow territory // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 3–4, pp. 583–588. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-583-588

них рисков — SIR+A. С помощью данной модели проведены оценка и прогноз заболеваемости ОРВИ-гриппом на территории Москвы в 2016 г. Введен и рассчитан новый параметр — интенсивность заражения, с помощью которого можно проводить достоверный анализ заболеваемости и осуществлять прогноз относительно ее изменения.

Ключевые слова: оценка, прогноз, заболеваемость, ОРВИ, грипп, математическая модель SIR+A.

SIR+A MATHEMATICAL MODEL FOR EVALUATING AND PREDICTING 2016–2017 ARVI-INFLUENZA INCIDENCE BY USING ON THE MOSCOW TERRITORY

Kontarov N.A.^{a,b}, Arkharova G.V.^a, Grishunina Yu.B.^c, Grishunina S.A.^{c,d}, Yuminova N.V.^b

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

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

^c A.N. Tikhonov Moscow Institute of Electronics and Mathematics, National Research University “Higher School of Economics”, Moscow, Russian Federation

^d Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Influenza is a major challenge to global healthcare due to its high transmissivity and ability to cause major epidemics. Influenza epidemics and pandemics are associated with changes in the society structure that contribute to the spread of new viral strains in certain environmental and social settings. Currently, influenza is one of the most common global diseases that results in annual epidemics or even pandemics, often leading to lethal outcome. Influenza viruses are uniquely prone to variability via point mutations, recombination and gene reassortment accompanied with changes in their biological properties considered as the main cause of uncontrolled infection spread. Hence, examining cohorts of predisposed individuals by using probability models provides not only additional information about viral outbreaks, but also allows monitoring dynamics of viral epidemics in controlled areas. Understanding influenza epidemiology is crucial for restructuring healthcare resources. Public healthcare service mainly relies on influenza vaccination. However, there are vulnerable cohorts such as elderly and immunocompromised individuals, which usually contain no protective anti-influenza virus antibody level. Despite advances in the developing vaccines and chemotherapy, large-scale influenza epidemics still continue to emerge. Upon that, no reliable methods for disease prognosis based on rate of ongoing epidemic situation are currently available. Monitoring and predicting emerging epidemics is complicated due to discrepancy between dynamics of influenza epidemics that might be evaluated by using surveillance data as well as platform for tracking influenza incidence rate. However, it may be profoundly exacerbated by mutations found in the influenza virus genome by altering genuine morbidity dynamics. Use of probabilistic models for assessing parameters of stochastic epidemics would contribute to more accurately predicted changes in morbidity rate. Here, an SIR+A probabilistic model considering a relationship between infected, susceptible and protected individuals as well as the aggressiveness of external risks for predicting changes in influenza morbidity rate that allowed to evaluate and predict the 2016 ARVI influenza incidence rate in Moscow area. Moreover, introducing an intensity of infection parameter allows to conduct a reliable analysis of incidence rate and predict its changes.

Key words: assessment, prediction, disease, ARVI, influenza, mathematical model, SIR+A.

Введение

Разработка и применение математических моделей, позволяющих оценить риски развития эпидемий острых респираторных вирусных инфекций и гриппа (ОРВИ-грипп), оказывается плодотворным для анализа и прогнозирования развития эпидемической ситуации [1–5]. Мониторинг и использование в расчетах недельной информации о заболеваемости ОРВИ-гриппом позволяет с высокой точностью проанализировать кинетику заболеваемости, выявить волны заболеваемости, определить присущие волнам характеристики и рассчитать параметры модели SIR+A, описывающей эпидемическую ситуацию и предоставляющей возможность ее прогноза в пределах районных территорий мегаполиса. С помощью математи-

ческой модели SIR+A построена новая система прогноза заболеваемости ОРВИ-гриппом, основанная на выявлении трендов, подтвержденных наличием корреляции между информативными признаками и/или параметрами эпидемической ситуации. Трендом является кинетическая или пространственная зависимость информативного признака и/или параметра эпидемической ситуации, аппроксимируемая известными математическими функциями. Прогноз осуществляется на основе ретроспективных и текущих данных заболеваемости.

Материалы и методы

На основе известной математической модели SIR (Восприимчивые, Инфицированные, Невосприимчивые) [3–5], описывающей из-

менение числа индивидуумов, вовлеченных в эпидемию, нами разработана и описана математическая модель SIR+A (Восприимчивые, Инфицированные, Невосприимчивые + Агрессивность внешних рисков, вовлекаемых в эпидемическую ситуацию). В предлагаемой статье приведены результаты анализа и прогноза с помощью математической модели SIR+A недельной заболеваемости ОРВИ-гриппом 55 районных территорий 11 округов Москвы. Проанализированы данные заболеваемости за год 6 млн жителей Москвы, обратившихся в лечебно-профилактические учреждения по полисам ОМС, из них 1 млн в связи с заболеваемостью ОРВИ-гриппом. Для обеспечения возможности сравнительного анализа данные заболеваемости в границах каждой районной территории нормированы на 100 000 обратившихся. Проведено ранжирование 55 районных территорий по шести диапазонам в зависимости от общего числа вовлеченных в заболеваемость ОРВИ-гриппом за год: низкая заболеваемость, ниже умеренной, умеренная, выше умеренной, высокая, аномально высокая. Выявлены кинетические тренды заболеваемости ОРВИ-гриппом в мегаполисе. Прослежены корреляции между 3-сигма диапазоном фоновой заболеваемости ОРВИ-гриппом в летние месяцы (Характеристика 1), пиковой заболеваемостью в течение года (Характеристика 2) и общим числом вовлекаемых в эпидемическую ситуацию за год (Характеристика 3) для 55 районных территорий. На основе сравнения ретроспективных и текущих данных Характеристики 1 рассчитаны прогнозы ожидаемых значений Характеристики 2 и 3. Среднее значение 3-сигма диапазона фоновой заболеваемости ОРВИ-гриппом, превосходящее 175–205 человек в неделю на 100 тыс. населения в границах районной территории мегаполиса, определено как приводящее к риску развития высокой и аномально высокой заболеваемости ОРВИ-гриппом в текущем году в границах этой районной территории. Предложены показатели и обоснованы критерии оценки эпидемической ситуации по заболеванию ОРВИ-гриппом в мегаполисе и на его районных территориях. Используемая система анализа с применением вероятностной модели SIR+A основана на выявлении корреляций между информативными признаками и/или параметрами эпидемической ситуации. Корреляцию принято считать сильной, если рассчитанный коэффициент корреляции между совокупностями численных значений превосходит 0,70. Если коэффициент корреляции находится в диапазоне 0,40–0,70, то корреляция признается умеренной. Применяемая система прогноза основана на выявлении трендов, подтвержденных наличием корреляции между ин-

формативными признаками и/или параметрами эпидемической ситуации. Под трендом понимается кинетическая или пространственная зависимость информативного признака и/или параметра эпидемической ситуации, аппроксимируемая известными математическими функциями, такими как линейная, параболическая, экспоненциальная и т.д. Прогноз строится на основе ретроспективных и текущих данных заболеваемости. Локус высокой заболеваемости ОРВИ-гриппом — территория, прилегающая к лечебному учреждению, по данным которого установлена высокая, в сравнении с другими территориями, общая за 2016 г. нормированная на 100 тыс. обратившихся заболеваемость ОРВИ-гриппом.

Результаты и обсуждение

Заболеваемость ОРВИ-гриппом в Москве, по информации районных лечебных учреждений, в 2016 г. носит двухволновой характер. Каждая волна заболеваемости имеет две фазы: первую с растущей недельной заболеваемостью, вторую — со спадающей. Первая волна приходится на 35–43 недели, то есть на сентябрь–октябрь, характеризуется невысоким числом вовлекаемых, вторая начинается на 47–48 неделе, то есть в последней декаде ноября, в новогодние недели испытывает пиковые значения недельной заболеваемости, затем наступает спадающая фаза, длящаяся до 22–23 недели следующего года, то есть вплоть до конца весны.

На большинстве районных территорий Москвы между первой и второй волнами заболеваемости ОРВИ-гриппом наблюдается отчетливое уменьшение недельной заболеваемости, то есть, в терминах физического критерия, первая и вторая волны разрешены (рис. 1А и 1Б). На некоторых районных территориях Москвы первая волна заболеваемости ОРВИ-гриппом переходит во вторую, не претерпевая выраженного минимума (рис. 1В).

На территории с более высокой годовой, за 2016 г., заболеваемостью с большей вероятностью регистрируется неразрешение первой и второй волн заболеваемости ОРВИ-гриппом. Так, из 27 районных территорий с заболеваемостью, большей 16 тыс. на 100 тыс. обратившихся, неразрешение первой и второй волн регистрируется на 11 территориях, то есть в 40% выборки. А из 29 районных территорий с заболеваемостью, меньшей 16 тыс. на 100 тыс. обратившихся, неразрешение первой и второй волн регистрируется на 7 территориях, то есть в 25% выборки. Годовая, за 2016 г., заболеваемость ОРВИ-гриппом по данным 56 районных лечебных учреждений Москвы имеет распределение по рангам, представленное на рисунке 2.

Заболееваемость ОРВИ-гриппом ниже умеренной (9–16 тыс. на 100 тыс. обратившихся) показали 20 районных территорий, образовав наиболее вероятный ранг распределения.

К примеру, умеренную заболеваемость ОРВИ-гриппом (16–23 тыс. на 100 тыс. обратившихся) показали 15 районных территорий, образовав второй по вероятности ранг распределения. На районной территории ВАО была зарегистрирована аномально высокую заболеваемость ОРВИ-гриппом (50 тыс. на 100 тыс. обратившихся).

Численные значения годовой за 2016 г. заболеваемости ОРВИ-гриппом и пиковые значения на районных территориях коррелируют между собой, коэффициент корреляции 0,77 (рис. 3):

На основании расчетов с помощью данной математической модели в 2017 г. прогнозировалось увеличение по сравнению с 2016 г. заболеваемости ОРВИ-гриппом на следующих районных территориях: СВАО, ул. Абрамцевская, 16, Клинико-диагностический центр № 5, в пределах ранга низкая заболеваемость; ЮВАО, ул. Авиатора Миля, 6-1, поликлиника № 23,

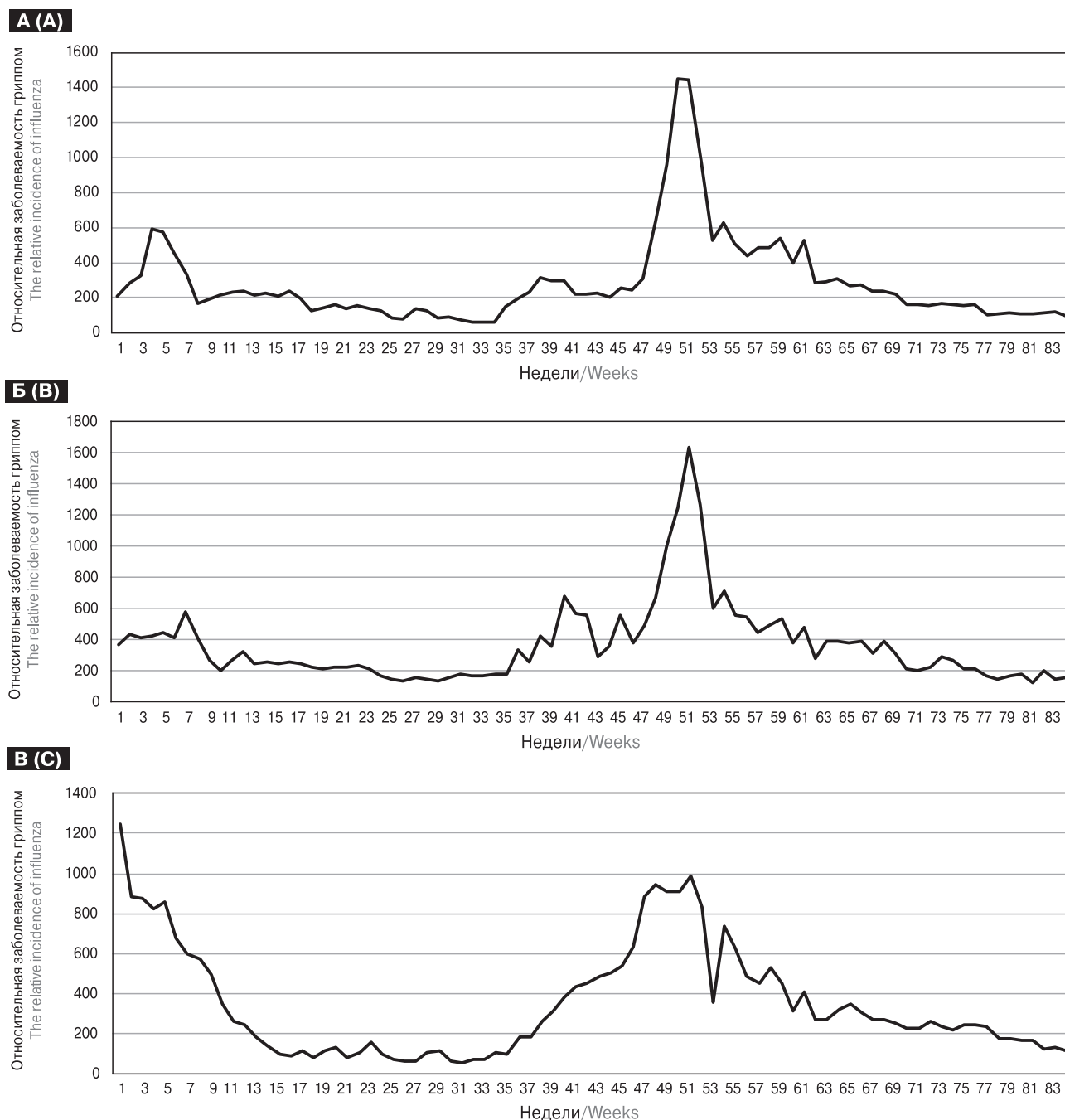


Рисунок 1. Понедельная заболеваемость ОРВИ-гриппом на данной территории 2016 г.
 Figures 1. Weekly incidence of ARVI-influenza in the area 2016 year

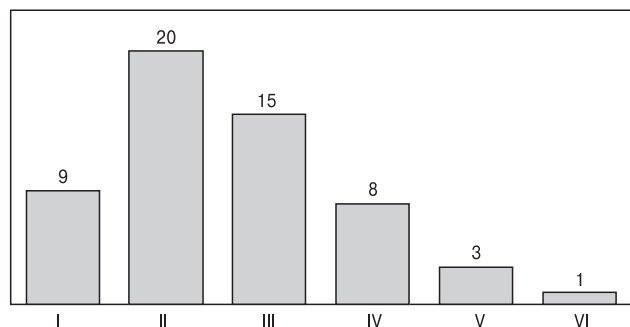


Рисунок 2. Заболеваемость ОРВИ-гриппом по рангам 2016 г.

Figure 2. Incidence of viral respiratory infections and flu through the ranks 2016 year

I — низкая 2–9 тыс.; II — ниже умеренной 9–16 тыс.; III — умеренная 16–23 тыс.; IV — выше умеренной 23–30 тыс.; V — высокая 30–35 тыс.; VI — аномально высокая 50 тыс.
 I — low incidence of influenza 2–9 thousand; II — below the moderate incidence of influenza 9–16 thousand; III — moderate incidence of influenza 16–23 thousand; IV — above the moderate incidence of influenza 23–30 thousand; V — high incidence of influenza 30–35 thousand; VI — abnormally high incidence of influenza 50 thousand.

в пределах ранга заболеваемость выше умеренной; ТиНАО, Щербинка, ул. Первомайская, 10, ГКБ Щербинка, в пределах ранга заболеваемость выше умеренной; поскольку полученные результаты реальной заболеваемости по ОРВИ-гриппу за первые 32 недели 2017 года на указанных территориях существенно превысили таковые за аналогичный период 2016 года.

Численные значения заболеваемости ОРВИ-гриппом за первые 32 недели 2017 г. на осталь-

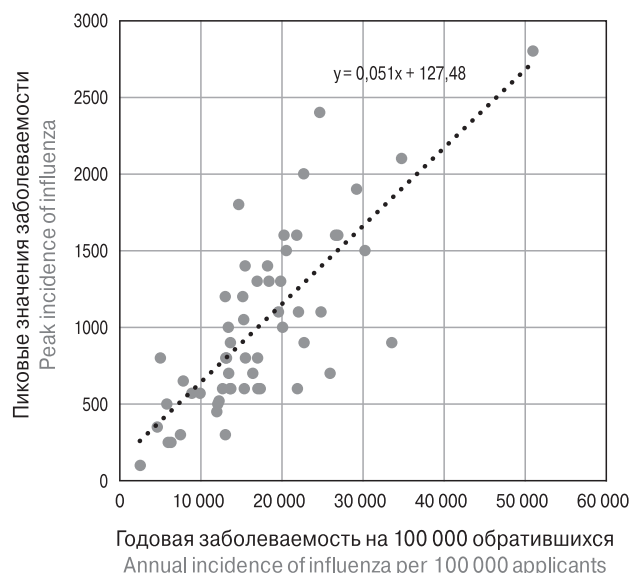


Рисунок 3. Годовая заболеваемость ОРВИ-гриппом и ее пиковые значения на районных территориях 2016 г.

Figure 3. Annual incidence of ARVI-influenza and its peak values in the district territories 2016 year

ных 53 районных территориях коррелируют с годовой за 2016 г., коэффициент корреляции 0,90 (рис. 4).

В соответствии с моделью SIR+A рассчитаны оценки интенсивности заражения ОРВИ-гриппом с оптимизацией по одному параметру — интенсивности заражения от одного больного при фоновой заболеваемости, оценки средней интенсивности заражения ОРВИ-гриппом за 2016 г. по административным округам Москвы

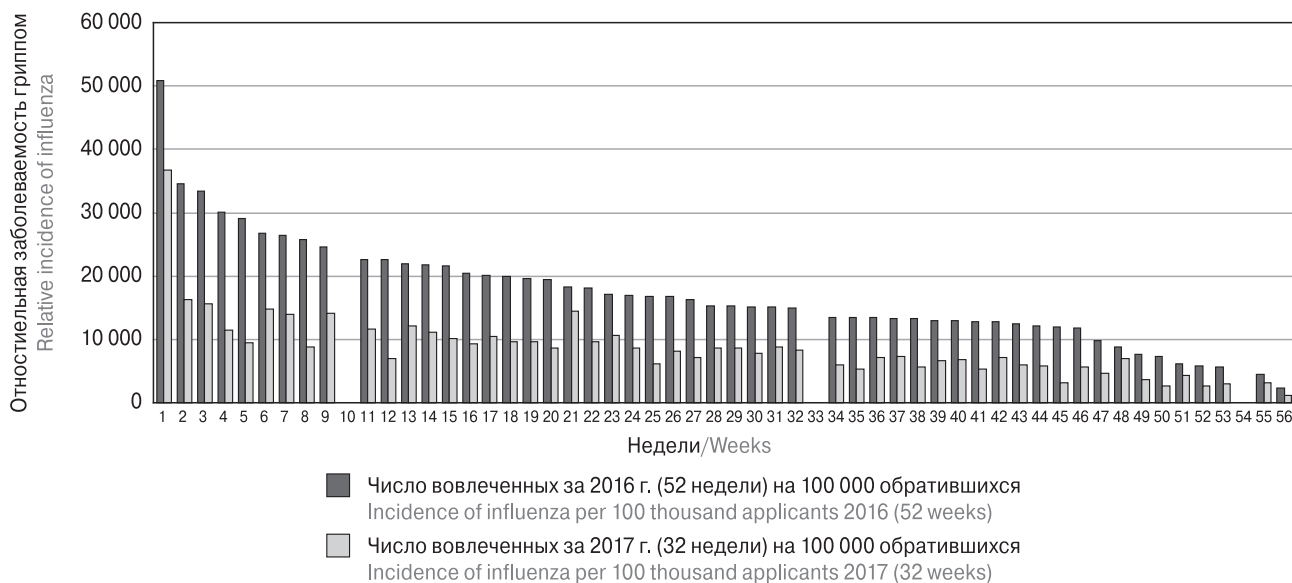


Рисунок 4. Заболеваемость ОРВИ-гриппом на 100 тыс. обратившихся по районным территориям: 2016 г (52 неделя), 2017 г. (32 неделя)

Figure 4. Incidence of ARVI-influenza per 100 thousand applicants for the district territories: 2016 (52 weeks), 2017 (32 weeks)

найденны в пределах 0,70–0,74 человек в неделю. Для обработки данных 58 локальных районных территорий, предоставивших информацию, разработана ЭВМ-программа для уточненной оценки интенсивности заражения с оптимизацией по трем параметрам модели SIR+A. По резуль-

татам ЭВМ-обработки данных заболеваемости ОРВИ-гриппом средняя, уточненная оптимизацией по трем переменным, оценка интенсивности заражения по Москве составила в 2016 г. 1,29 человек в неделю, а в 2017 г. интенсивность заражения λ снизилась до 1,09 человек в неделю.

Список литературы/References

1. Бароян О.В., Рвачев Л.А., Иванников Ю.Г. Моделирование и прогнозирование эпидемий гриппа для территории СССР. М.: Медицина, 1977. 546 с. [Baroian O.V., Rvachev L.A., Ivannikov Yu.G. Modeling and prediction of influenza epidemics for the territory of the USSR. Moscow: Meditsina, 1977. 546 p. (In Russ.)]
2. Бейли Н. Математика в биологии и медицине. Москва: Мир, 1970. 326 с. [Bailey N. Mathematics in biology and medicine. Moscow: Mir, 1970. 326 p. (In Russ.)]
3. Economou A., Lopez-Herrero M.J. The deterministic SIS epidemic model in a Markovian random environment. *J. Math. Biol.*, 2016, vol. 73, no. 1, pp. 91–121. doi: 10.1007/s00285-015-0943-7
4. Pellis L, House T, Keeling M.J. Exact and approximate moment closures for non-Markovian network epidemics. *J. Theor. Biol.*, 2015, vol. 382, pp. 160–177. doi: 10.1016/j.jtbi.2015.04.039
5. Rebuli N.P., Bean N.G., Ross J.V. Hybrid Markov chain models of S-I-R disease dynamics. *J. Math. Biol.*, 2017, vol. 75, no. 3, pp. 521–541. doi: 10.1007/s00285-016-1085-2

Авторы:

Контаров Н.А., к.б.н., доцент кафедры медицинской и биологической физики ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия; ведущий научный сотрудник лаборатории детских вирусных инфекций ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Архарова Г.В., к.б.н., доцент кафедры медицинской и биологической физики ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия;
Гришунина Ю.Б., старший преподаватель департамента прикладной математики Московского института электроники и математики им. А.Н. Тихонова Национального исследовательского университета «Высшая школа экономики», Москва, Россия;
Гришунина С.А., ассистент департамента прикладной математики Московского института электроники и математики им. А.Н. Тихонова Национального исследовательского университета «Высшая школа экономики», Москва, Россия; аспирант кафедры теории вероятностей механико-математического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;
Юминова Н.В., д.б.н., зам. директора по науке, зав. лабораторией детских вирусных инфекций ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия.

Authors:

Kontarov N.A., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Medical and Biological Physics, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation; Senior Researcher, Laboratory of Childhood Viral Infections, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Arkharova G.V., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Medical and Biological Physics, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;
Grishunina Yu.B., Senior Lecturer, Department of Applied Mathematics, A.N. Tikhonov Moscow Institute of Electronics and Mathematics, National Research University "Higher School of Economics", Moscow, Russian Federation;
Grishunina S.A., Assistant Professor, Department of Applied Mathematics, A.N. Tikhonov Moscow Institute of Electronics and Mathematics, National Research University "Higher School of Economics", Moscow, Russian Federation; PhD Student, Department of Probability Theory, Faculty of Mechanics and Mathematics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation;
Yuminova N.V., PhD, MD (Biology), Professor, Deputy Director for Science, Head of the Laboratory of Childhood Viral Infections, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 06.03.2019
 Отправлена на доработку 22.03.2019
 Принята к печати 28.05.2019

Received 06.03.2019
 Revision received 22.03.2019
 Accepted 28.05.2019

К ОБНАРУЖЕНИЮ ПСОРИАТИЧЕСКОГО АНТИГЕНА КАК НЕКОТОРОГО АНАЛОГА ИНФЕКЦИОННЫХ ПРИОННЫХ БЕЛКОВ

Б.Ф. Синицын

Медицинская академия имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского», г. Симферополь, Россия

Резюме. Псориатический антиген, то есть специфический антиген инфекционного агента, с которым может быть связана этиология псориаза, до настоящего времени не обнаружен, и это служит одним из существенных доводов против инфекционной теории псориаза. Однако отсутствие специфических для псориаза антигенов гипотетически можно объяснить тем, что носитель псориатического антигена является некоторым аналогом инфекционных прионных белков (аналогом PrP^{Sc}) и, будучи идентичным одному из белков эпидермиса людей, не болеющих псориазом, отличается от антигенно родственного ему нормального белка, как и PrP^{Sc} , устойчивостью к пищеварительным ферментам. А поскольку цитопатогенное действие PrP^{Sc} связано с их локализацией в структурах клеток поражаемой ими ткани, то, как и в случае с PrP^{Sc} , возможно обнаружение носителя псориатического антигена в пепсиновых гидролизатах структур псориатических сквамозных элементов, что и явилось целью исследования. Материалами исследования служили псориатические сквамозные элементы и роговой слой эпидермиса, отторгаемый у здоровых людей, который снимался с пяток металлической теркой. Сквамозные элементы гомогенизировались в изотоническом растворе натрия хлорида, после чего гомогенизированные структуры сквамозных элементов отделялись центрифугированием от их растворимых составляющих. Гомогенаты структур сквамозных элементов, а также супернатанты их гомогенатов подвергались пепсиновому гидролизу. В пепсиновых гидролизатах структур сквамозных элементов, а также в супернатантах их гомогенатов, до их пепсинового гидролиза и после, определялись антигены и их идентичность иммунопреципитацией в агаре по Оухтерлони с помощью антисыворотки, полученной иммунизацией кроликов гомогенатом структур псориатических сквамозных элементов. В результате исследования оказалось, что в пепсиновых гидролизатах гомогенатов структур псориатических сквамозных элементов преципитируются два антигена, что свидетельствует об устойчивости носителей этих антигенов к ацидин-пепсину. Однако только один из этих антигенов, в отличие от всех других преципитируемых во всех исследуемых субстратах антигенов, может рассматриваться как псориатический антиген, являющийся некоторым аналогом PrP^{Sc} , поскольку, будучи идентичным одному из антигенов супернатантов гомогенатов рогового слоя эпидермиса, отторгаемого у здоровых людей, он отличается, как и PrP^{Sc} , от антигенно родственного ему нормального белка устойчивостью к ацидин-пепсину. Следовательно, хотя и подтверждены данные литературы, согласно которым специфические для возбудителя псориаза антигены не существуют, тем не менее это не является достаточным основанием для того, чтобы отвергнуть инфекционную теорию псориаза, поскольку псориатический антиген обладает некоторыми свойствами, аналогичными таковым у PrP^{Sc} .

Ключевые слова: псориаз, сквамозные элементы, ацидин-пепсин, пепсиновый гидролиз, псориатический антиген, инфекционные прионные белки, PrP^{Sc} , аналог PrP^{Sc} .

Адрес для переписки:

Синицын Борис Федорович
295051, Россия, Республика Крым, г. Симферополь,
б-р Ленина, 5/7, Медицинская академия имени
С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный
университет имени В.И. Вернадского».
Тел.: 8 (978) 835-03-78.
E-mail: dr.boris.sinitsyn@gmail.com

Contacts:

Boris. F. Sinitsyn
295051, Russian Federation, Simferopol, Lenin Boulevard, 5/7,
S.I. Georgievsky Medical Academy, Crimean Federal
V.I. Vernadsky University.
Phone: +7 (978) 835-03-78.
E-mail: dr.boris.sinitsyn@gmail.com

Библиографическое описание:

Синицын Б.Ф. К обнаружению псориатического антигена как некоторого аналога инфекционных прионных белков // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 3–4. С. 589–594. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-589-594

Citation:

Sinitsyn B.F. Detecting a psoriatic antigen analogous to infectious prion proteins // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 3–4, pp. 589–594. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-589-594

DETECTING A PSORIATIC ANTIGEN ANALOGOUS TO INFECTIOUS PRION PROTEINS

Sinitsyn B.F.

S.I. Georgievsky Medical Academy, Crimean Federal V.I. Vernadsky University, Simferopol, Russian Federation

Abstract. Until now, psoriatic antigen as a specific antigen derived from some infectious agent potentially related to origin of psoriasis has not been identified, thereby strongly arguing against infectious theory of psoriasis. However, the lack of specific psoriasis-associated antigens may be theoretically accounted for by an idea that psoriatic antigen could be analogous to infectious prion proteins (*PrP^{Sc}* analogue). It might be identical to some epidermal protein in psoriasis-free subjects that might differ antigenically from related normal protein by resistance to digestive enzymes similarly to *PrP^{Sc}*. Since *PrP^{Sc}* cytopathogenic effect is associated with its location within cell structures of affected body tissue, by analogy with *PrP^{Sc}* we aimed at identifying a potential carrier of psoriatic antigen by examining peptic hydrolysates of psoriatic squamous elements. Psoriatic squamous elements and epidermal stratum corneum were collected from heel area of healthy subjects with a metal grater for further examination. Squamous elements were homogenized in isotonic saline followed by centrifugation to separate them from soluble components. Homogenates of squamous elements structures and their homogenate supernatants underwent peptic hydrolysis reaction. Antigens and their identity were analysed by Ouchterlony immunoprecipitation in agar with antiserum obtained after immunizing rabbits with homogenate of the psoriatic squamous element structures, before and after hydrolysis, using peptic hydrolysates of squamous element structures and relevant supernatants. It was found that two antigens were precipitated in peptic hydrolysates of homogenates of psoriatic squamous cell structures, underlying acidin-pepsin resistance of antigen carriers. However, compared to the remainder of antigens precipitated in examined substrates only one out of two antigens might be considered as a psoriatic antigen being some *PrP^{Sc}* analogue that was identical to one of supernatant antigens derived from epidermal stratum corneum homogenates collected from healthy subjects. Similar to *PrP^{Sc}*, it differed from antigenically related normal protein by acidin-pepsin resistance. Albeit confirming available reports revealing no psoriasis-associated pathogen-specific antigens, this, nonetheless, might not be sufficient for rejecting infectious theory of psoriasis, as psoriatic antigen exhibits some properties similar to those of *PrP^{Sc}*.

Key words: psoriasis, squamous elements, acidin-pepsin, peptic hydrolysis, psoriatic antigen, infectious prion proteins, *PrP^{Sc}*, *PrP^{Sc}* analogue.

Пораженность псориазом населения Земли в среднем составляет 2–4%, достигая в некоторых районах 10%. Наблюдается рост заболеваемости псориазом с превалированием тяжелых форм [6]. Несмотря на выявление многочисленных локусов восприимчивости, ни одна генетическая детерминанта не была идентифицирована как ответственная за индукцию псориаза, а его возникновение связывается с различными экологическими и микробными пусковыми факторами, которые рассматриваются как триггеры для аутоиммунных расстройств, возникающих с участием макрофагов, Т-клеток и кератиноцитов, продуцирующих медиаторы, которые, в свою очередь, поддерживают эпидермальную гиперплазию. В связи с этим в основу лечения в большей части тяжелых форм псориаза положена патогенетическая терапия, в которой ведущее место занимает иммуносупрессия [8]. Однако иммуносупрессивная терапия псориаза не эффективна настолько, чтобы ее прекращение не сопровождалось возвращением клинических проявлений, а при ее продолжении у части больных может наблюдаться активация возбудителей тяжелых инфекций [7]. Поэтому существует необходимость поиска такого подхода к лечению псориаза, при котором сохранялось бы полноценное функционирование всех составляющих системы иммуни-

тета [9], а опыт борьбы с инфекционными заболеваниями показывает, что таким требованиям в наибольшей степени соответствует этиотропная терапия.

Однако сложилось мнение, согласно которому псориаз не может быть инфекционным заболеванием, поскольку за всю историю его изучения не зарегистрировано случаев заражения здоровых людей от больных псориазом [11]. Тем не менее псориаз может оказаться зоонозом или сапронозом, при которых человек для возбудителя заболевания нередко оказывается биологическим тупиком [3]. В качестве другого существенного довода против инфекционной теории псориаза служит то, что псориатический антиген, то есть специфический антиген инфекционного агента, с которым может быть связана этиология псориаза, до настоящего времени не обнаружен [12, 13]. Однако существует гипотеза, согласно которой аналоги инфекционных прионных белков (аналоги *PrP^{Sc}*) [5, 10] могут оказаться возбудителями некоторых заболеваний, этиология которых не установлена. В связи с этим отсутствие специфических для псориаза антигенных детерминант предположительно можно объяснить в рабочей гипотезе тем, что псориатический антиген является некоторым аналогом инфекционных прионных белков *PrP^{Sc}*, а аналогии его свойств с этими

белками выражаются в антигенном родстве с одним из белков эпидермиса людей, не болеющих псориазом, но, как *PrP^{Sc}* отличается от антигенно родственного ему *PrP^C* устойчивостью к протеазам [2, 14], так и псориатический антиген отличается от антигенно родственного ему эпидермального белка устойчивостью к пищеварительным ферментам с протеолитической активностью. При опоре на рабочую гипотезу способ обнаружения псориатического антигена может состоять в следующем. По данным литературы, *PrP^{Sc}* обнаруживается в структурных (мембранных) образованиях клеток [15], а при реализации алиментарного пути заражения прионными болезнями в ходе пепсинового гидролиза из структур пораженной ткани освобождается резистентное к протеиназе К ядро *PrP^{Sc}*, участвующее в передаче прионных заболеваний и их патогенезе [14]. Следовательно, допуская существование псориатического антигена, являющегося некоторым аналогом инфекционных прионных белков, и рассматривая псориатические сквамозные элементы как факторы его передачи, можно предположить возможность его обнаружения в пепсиновых гидролизатах гомогенатов структур псориатических сквамозных элементов в связи с тем, что, будучи устойчивым к гидролизу пепсином псориатическим антигеном, он может отличаться антигенной специфичностью от устойчивых к гидролизу пепсином эпидермальных антигенов, а будучи некоторым аналогом *PrP^{Sc}*, псориатический антиген может оказаться антигенно идентичным одному из чувствительных к гидролизу пепсином эпидермальных белков, определяемых в роговом слое эпидермиса, отторгаемого у здоровых людей. При этом методом его определения и идентичных ему антигенов может служить иммунопреципитация в агаре по Оухтерлони, поскольку вместе с выявлением растворимых антигенов этот метод позволяет определять их идентичность [1].

Поэтому цель исследования состояла в обнаружении в структурах псориатических сквамозных элементов псориатического антигена как некоторого аналога инфекционных прионных белков (далее — псориатический антиген *PsPSc*). При этом первая задача заключалась в выявлении в пепсиновых гидролизатах структур псориатических сквамозных элементов антигенов и в определении среди них псориатического антигена *PsPSc*, как отличающегося антигенной специфичностью от устойчивых к гидролизу пепсинов эпидермальных антигенов. Вторая задача состояла в определении псориатического антигена *PsPSc* как антигенно идентичного одному из чувствительных к гидролизу пепсином эпидермальных белков (далее — эпидермальный белок *PsPC*).

Материалы и методы

Материалами исследования служили псориатические сквамозные элементы десяти больных обыкновенным распространенным псориазом, а также роговой слой эпидермиса десяти здоровых людей, который снимался с пяток металлической теркой. Таким образом, исследовались сквамозные элементы, которые после их отторжения как у больных псориазом, так и у здоровых людей в тех или иных количествах могут поступать в организм человека алиментарным путем и, оказавшись в желудке, подвергаться пепсиновому гидролизу.

К одному грамму сквамозных элементов до 10 мл приливался изотонический раствор NaCl. Взвесь гомогенизировалась путем растирания со стеклом в фарфоровой ступке, а затем центрифугировалась при 1500g 20 мин с тем, чтобы исследовать антигены структур сквамозных элементов и антигены, локализующиеся за пределами их структур.

Плотные осадки, являющиеся гомогенизированными структурами отторгаемых сквамозных элементов, отмывались изотоническим раствором NaCl путем многократного ресуспендирования и центрифугирования при 1500g 20 мин. Затем к ним до 10 мл приливался изотонический раствор NaCl, а в полученной взвеси растворялись 2 таблетки ацидин-пепсина. При этом был использован ацидин-пепсин производства РУП «Белмедпрепараты», применяемый для заместительной терапии при гипо- и анацидных гастритах и ахилии. Одна таблетка ацидин-пепсина содержит бетаина гидрохлорида (ацидина) — 0,2 г, свиного пепсина (в пересчете на 100% пепсин) — 0,005 г. После суток инкубации при 37°C рН растворов доводился до 8 гидрокарбонатом натрия и в полученных гидролизатах определялись солиублизированные из структур исследуемых сквамозных элементов пепсином антигены.

Для определения чувствительности к пепсиновому гидролизу носителей антигенов, локализующихся за пределами структур исследуемых сквамозных элементов, в 5 мл супернатантов гомогенатов сквамозных элементов растворялась одна таблетка ацидин-пепсина и после суток инкубации при 37°C рН растворов доводился до 8 гидрокарбонатом натрия, а полученные гидролизаты использовались в работе.

Определение антигенов проводилось в двойной радиальной иммунодиффузии в агаре по Оухтерлони с помощью преципитирующей антипсориатической сыворотки, полученной путем иммунизации кроликов гомогенатами структур псориатических сквамозных элементов с полным адьювантом Фрейнда. На стекла со стороной 60 мм в объеме 6 мл разливался 3%

агар Дифко, который расплавлялся в изотоническом растворе NaCl на водяной бане. После застывания в агаре вырезались лунки пробойником с диаметром 13 мм. В центральную лунку вносилось 0,3 мл антисыворотки, а в расположенные вокруг лунки на расстоянии 5 мм вносились исследуемые ингредиенты по 0,1 мл. После трех суток инкубации агар отмывался сменяемым изотоническим раствором NaCl, затем дистиллированной водой и высушивался, а линии преципитации окрашивались кислотным сине-черным.

Результаты и обсуждение

Поскольку первая задача заключалась в выявлении в пепсиновых гидролизатах структур псориаитических сквамозных элементов антигенов и определении среди них псориаитического антигена *PsPSc* как отличающегося антигенной специфичностью от устойчивых к гидролизу пепсином эпидермальных антигенов, то воздействию ацидин-пепсином подвергались как оказавшиеся в осадке после центрифугирования гомогенизированные структуры исследуемых сквамозных элементов, так и супернатанты их гомогенатов. Оказалось, что в пепсиновых гидролизатах структур псориаитических сквамозных элементов определяются два антигена, о чем свидетельствует их преципитация с образованием двух линий (рис. 1, две линии преципитации антигенов между лунками А и 1). При этом



Рисунок 1. Псориаитический антиген *PsPSc* (устойчив к гидролизу пепсином), линия его преципитации (указана горизонтальной стрелкой) не имеет продолжения в зоны преципитации других устойчивых к гидролизу пепсинов антигенов

Figure 1. Psoriatic antigen *PsPSc* (resistant to hydrolysis with pepsin), the line of its precipitation, indicated by the horizontal arrow, has no continuation in the zone of precipitation of other pepsin antigens resistant to hydrolysis

антиген, преципитируемый с образованием ближней к лунке с антисывороткой линии, преципитируется не только в пепсиновых гидролизатах гомогенатов структур и в пепсиновых гидролизатах супернатантов гомогенатов псориаитических сквамозных элементов, но и в пепсиновых гидролизатах структур и в пепсиновых гидролизатах супернатантов гомогенатов рогового слоя эпидермиса, отторгаемого у здоровых людей (рис. 1, ближняя к лунке А линия преципитации антигена между лунками А и 1 продолжается в линию преципитации между лунками А и 4, далее в линию преципитации между лунками А и 3, далее в линию преципитации между лунками А и 2). Следовательно, преципитируемый с образованием этой линии антиген является устойчивым к гидролизу пепсином эпидермальным антигеном.

Однако антиген, преципитируемый с образованием дальней от лунки с антисывороткой линии, предварительно может рассматриваться как псориаитический антиген *PsPSc*, поскольку обладает одним из характеризующих его в рабочей гипотезе свойств: отличается антигенной специфичностью от других устойчивых к гидролизу пепсинов эпидермальных антигенов. Об этом свидетельствует линия его преципитации, определяемая только в пепсиновых гидролизатах гомогенатов структур псориаитических сквамозных элементов, то есть не имеющая продолжения ни в зону преципитации антигенов пепсиновых гидролизатов супернатантов гомо-

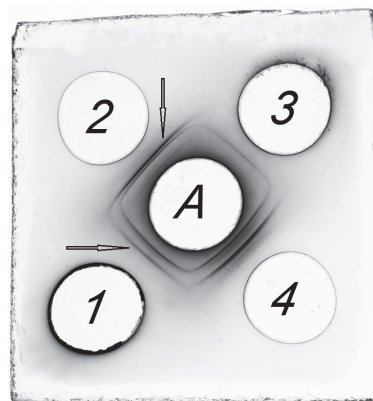


Рисунок 2. Псориаитический антиген *PsPSc* (устойчив к гидролизу пепсином), линия его преципитации, указанная горизонтальной стрелкой, продолжается в линию преципитации эпидермального белка *PsPC* (чувствителен к гидролизу пепсином), указанную вертикальной стрелкой

Figure 2. Psoriatic antigen *PsPSc* (resistant to hydrolysis with pepsin), the line of its precipitation, indicated by the horizontal arrow, continues in the line of the epidermal protein precipitation *PsPC* (sensitive to hydrolysis with pepsin), indicated by the vertical arrow

генатов рогового слоя эпидермиса, отторгаемого у здоровых людей, ни в зону преципитации антигенов пепсиновых гидролизатов супернатантов гомогенатов псориаического сквамозных элементов и отсутствующая в пепсиновых гидролизатах структур рогового слоя эпидермиса, отторгаемого у здоровых людей (рис. 1, дальняя от лунки А линия преципитации между лунками А и 1 не имеет продолжения ни в зону преципитации антигенов между лунками А и 2, ни в зону преципитации антигенов между лунками А и 4 и отсутствует в зоне преципитации между лунками А и 3).

Поскольку содержание второй задачи состояло в определении псориаического антигена *PsPSc* как антигенно идентичного эпидермальному белку *PsPC*, то есть одному из чувствительных к гидролизу пепсином белков супернатантов гомогенатов рогового слоя эпидермиса, отторгаемого у здоровых людей, то супернатанты гомогенатов исследуемых сквамозных элементов уже не подвергались воздействию ацидин-пепсина. И оказалось, что, как и в предыдущем исследовании, антиген, преципитируемый с образованием ближней к лунке с антисывороткой линии, преципитируется во всех исследуемых субстратах, то есть не только в пепсиновых гидролизатах гомогенатов структур и в супернатантах гомогенатов псориаического сквамозных элементов, но и в пепсиновых гидролизатах структур и в супернатантах гомогенатов рогового слоя эпидермиса, отторгаемого у здоровых людей (рис. 2, ближняя к лунке А линия преципитации антигена между лунками А и 1 продолжается в линию преципитации между лунками А и 4, далее в линию преципитации между лунками А и 3, далее в линию преципитации между лунками А и 2). Тем самым подтверждается, что преципитируемый с образованием этой линии антиген является эпидермальным антигеном.

Однако дальняя от лунки с антисывороткой линия преципитации в пепсиновых гидролизатах гомогенатов структур псориаического сквамозных элементов, с образованием которой преципитирован псориаический антиген *PsPSc*, уже имеет продолжения в одну из линий преципитации антигенов супернатантов гомогенатов рогового слоя эпидермиса, отторгаемого у здоровых людей, которые, в отличие от предыдущего исследования, не подвергались воз-

действию ацидин-пепсина. Следовательно, линия преципитации, являющаяся продолжением линии преципитации псориаического антигена *PsPSc*, свидетельствует о преципитации эпидермального белка *PsPC*, антигенно идентичного псориаическому антигену *PsPSc*, но отличающегося от него чувствительностью к гидролизу пепсином (рис. 2, дальняя от лунки А линия преципитации между лунками А и 1 продолжается в линию преципитации между лунками А и 2, где и прерывается). Тем самым подтверждается рабочая гипотеза и в той ее части, где псориаический антиген *PsPSc* рассматривается как некоторый аналог инфекционных прионных белков *PrP^{Sc}*: будучи антигенно идентичным одному из эпидермальных белков, псориаический антиген *PsPSc* отличается, как и *PrP^{Sc}*, от антигенно родственного ему нормального белка устойчивостью к гидролизу пепсином.

В связи с этим показательно предыдущее исследование, в результате которого при использовании сочетания тех же методов оказалось, что псориаический антиген отличается от антигенно родственного ему белка в эпидермисе, отторгаемом в области солнечного ожога у людей, не болеющих псориаизом, устойчивостью к гидролизу пепсином [4].

Таким образом, полученные результаты соответствуют данным литературы, согласно которым в очагах псориаического воспаления специфический только для больных псориаизом псориаический антиген не обнаруживается [12, 13]. Тем не менее это не является достаточным основанием для того, чтобы отвергнуть инфекционную теорию псориаиза, поскольку псориаический антиген *PsPSc* обнаружен как отличающийся антигенной специфичностью от других устойчивых к гидролизу пепсином эпидермальных антигенов. А будучи антигенно идентичным одному из эпидермальных белков людей, не болеющих псориаизом, псориаический антиген *PsPSc* отличается от него устойчивостью к пепсину, то есть обладает свойством, которое у *PrP^{Sc}* определяет не только алиментарный путь их поступления в организм человека, но и производимые ими цитопатогенные эффекты [14, 15], и, следовательно, псориаический антиген *PsPSc* может оказаться причиной тех патологических изменений, которые наблюдаются при псориаизе.

Список литературы/References

1. Берзовски Дж.А., Берковер А.Дж. Взаимодействие антиген-антитело // Иммунология. Под ред. У. Пола; пер. с англ. Т.Н. Власик. М.: Мир, 1989. Т. 3. С. 5–88. [Berzofski Dzh.A., Berkover A.Dzh. Antigen-antibody interaction. In: Immunology; ed. Paul W.E. Moscow: Mir, 1989. Vol. 3, pp. 5–88. (In Russ.)]
2. Зуев В.А., Завалишин И.А., Ройхель В.М. Прионные болезни человека и животных. М.: Медицина, 1999. 192 с. [Zuev V.A., Zavalishin I.A., Roikhel V.M. Prion diseases of humans and animals. Moscow: Meditsina, 1999. 192 p. (In Russ.)]

3. Покровский В.И., Черкасский Б.Л. Специфика эпидемиологии инфекционных болезней. Руководство по эпидемиологии инфекционных болезней. Под ред. В.И. Покровского. М.: Медицина, 1993. Т. 1. С. 5–24. [Pokrovskiy V.I., Cherkasskiy B.L. Epidemiology specificity of infectious diseases. In: Pokrovskiy V.I. Guide to the epidemiology of infectious diseases. Moscow: Meditsina, 1993. Vol. 1, pp. 5–24. (In Russ.)]
4. Синецын Б.Ф. Обнаружение аналога инфекционных прионных белков при псориазе в объяснении высокого риска фотоканцерогенеза при интенсивной инсоляции // Вестник физиотерапии и курортологии. 2017. Т. 23, № 3. С. 29–36. [Sinitsyn B.F. Detection of infectious prion proteins analogue in psoriasis while explaining the high risk of photocarcinogenesis when intense insolation. Vestnik fizioterapii i kurortologii = Herald of Physiotherapy and Health Resort Therapy, 2017, vol. 23, no. 3, pp. 29–36. (In Russ.)]
5. Тер-Аванесян М.Д. Феномен «прионизации» дрожжевых белков // Зуев В.А., Завалишин И.А., Ройхель В.М. Прионные болезни человека и животных. М.: Медицина, 1999. С. 161–170. [Ter-Avanesyan M.D. The phenomenon of “prionisation” of yeast proteins. In: Zuev V.A., Zavalishin I.A., Roikhel V.M. Prion diseases of humans and animals. Moscow: Meditsina, 1999, pp. 161–170. (In Russ.)]
6. Терлецкий О.В. Псориаз. Дифференциальная диагностика «псориазоподобных» редких дерматозов. Терапия. Медицинский атлас. СПб.: ДЕАН, 2007. 510 с. [Terletskiy O.V. Psoriasis. Differential diagnosis of “psoriasis-like” rare dermatoses. Therapy. Medical Atlas. St. Petersburg: DEAN, 2007. 510 p. (In Russ.)]
7. Altenburg A., Augustin M., Zouboulis C.C. [Side effects of biologic therapies in psoriasis]. Hautarzt, 2018, vol. 69, no. 4, pp. 290–297. doi: 10.1007/s00105-018-4156-z. (In German).
8. Ayala-Fontánez N., Soler D.C., McCormick T.S. Current knowledge on psoriasis and autoimmune diseases. Psoriasis (Auckl.), 2016, vol. 6, pp. 7–32. doi: 10.2147/PTT.S64950
9. Ayroldi E., Bastianelli A., Cannarile L., Petrillo M.G., Delfino D.V., Fierabracci A. A pathogenetic approach to autoimmune skin disease therapy: psoriasis and biological drugs, unresolved issues, and future directions. Curr. Pharm. Des., 2011, vol. 17, no. 29, pp. 3176–3190.
10. Batlle C., Iglesias V., Navarro S., Ventura S. Prion-like proteins and their computational identification in proteomes. Expert. Rev. Proteomics, 2017, vol. 14, no. 4, pp. 335–350. doi: 10.1080/14789450.2017.1304214
11. Crow J.M. Psoriasis uncovered. Nature, 2012, vol. 492, no. 7429, pp. 50–51. doi: 10.1038/492S50a
12. Juhlin L., Scheynius A., Klareskog L. Immunohistochemical reactivity of monoclonal antibodies generated after immunization of mice with cells from a psoriatic lesion. Acta Dermatovenerol., 1989, vol. 69, no. 2, pp. 93–100.
13. Mälkonen T., Suomela S. What do we know about pathogenesis of psoriasis? Duodecim, 2011, vol. 127, no. 15, pp. 1579–1589.
14. Mishra R.S., Basu S., Gu Y., Luo X., Zou W.Q., Mishra R., Li R., Chen S.G., Gambetti P., Fujioka H., Singh N. Protease-resistant human prion protein and ferritin are cotransported across Caco-2 epithelial cells: implications for species barrier in prion uptake from the intestine. J. Neurosci., 2004, vol. 24, no. 50, pp. 11280–11290. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2864-04.2004
15. Shim S.Y., Karri S., Law S., Schatzl H.M., Gilch S. Prion infection impairs lysosomal degradation capacity by interfering with rab7 membrane attachment in neuronal cells. Sci Rep., 2016, vol. 6: 21658. doi: 10.1038/srep21658

Автор:

Синецын Б.Ф., к.м.н., доцент, доцент кафедры инфекционных болезней Медицинской академии имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», г. Симферополь, Республика Крым, Россия.

Author:

Sinitsyn B.F., PhD (Medicine), Associate Professor, Associate Professor of the Department of Infectious Diseases, S.I. Georgievsky Medical Academy, Crimean Federal V.I. Vernadsky University, Simferopol, Russian Federation.

Поступила в редакцию 20.05.2018
Отправлена на доработку 22.03.2019
Принята к печати 24.04.2019

Received 20.05.2018
Revision received 22.03.2019
Accepted 24.04.2019

АНАЛИЗ ВЫЖИВАЕМОСТИ БОЛЬНЫХ ВПЧ-АССОЦИИРОВАННЫМ И ВПЧ-НЕГАТИВНЫМ РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ

М.К. Ибрагимова^{1,2}, М.М. Цыганов¹, О.Н. Чуруксаева¹, Л.А. Коломиец^{1,3},
Н.В. Литвяков^{1,2}

¹ НИИ онкологии ФГБНУ Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, г. Томск, Россия

² Институт биологии, экологии, почвоведения сельского и лесного хозяйства ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», г. Томск, Россия

³ ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Томск, Россия

Резюме. На сегодняшний день в литературе крайне малочисленны работы, которые бы освещали проблему особенностей возникновения, развития, течения и прогноза для пациенток с ВПЧ-отрицательными опухолями шейки матки, при этом показаны данные о высокой частоте рецидивов и смертности у пациенток с ВПЧ-негативными опухолями области головы и шеи. В настоящей работе методом ПЦР в режиме реального времени (real-time PCR) исследованы соскобы эпителия цервикального канала и наружной части шейки матки 116 больных первичным раком шейки матки (РШМ) I–IV стадий в возрасте от 24 до 79 лет. Определено наличие/отсутствие вируса папилломы человека (ВПЧ) 12 высокоонкогенных типов, проведены генотипирование и оценка вирусной нагрузки у пациенток, включенных в исследование. У 84 (72,4%) больных установлено наличие ВПЧ высокого канцерогенного риска (ВКР), у 32 больных (27,6%) вируса в опухоли выявлено не было. Таким образом было сформировано 2 группы пациенток — с наличием инфицированности вирусом папилломы человека (группа ВПЧ-положительных пациенток) и с отсутствием инфицированности ВПЧ (группа ВПЧ-негативных пациенток). Генотипирование ВПЧ-положительных образцов выявило, что 16 генотип ВПЧ встречается в 67,8% случаев, что не противоречит мировым литературным данным. Для обеих групп, включенных в исследование, оценена безрецидивная и общая выживаемость. Показано достоверное снижение выживаемости, а также преобладание худшего прогноза для больных ВПЧ-негативным РШМ, при этом сроки наблюдения безрецидивной выживаемости для групп ВПЧ-положительных и ВПЧ-отрицательных пациенток оставили 102 и 68 месяцев, общей — 52 и 83 месяца соответственно. В настоящее время показано, что частота рецидивирования, течение и прогрессирование РШМ находится в прямой зависимости от распространенности злокачественного процесса на момент первичного обращения. Большая часть рецидивов РШМ диагностируется в течение первых двух лет после окончания лечения. Согласно данным литературы, прослеживается увеличение частоты возникновения рецидивов при поздних стадиях заболевания. При этом биологическое поведение опухолей остается в достаточной степени непредсказуемым даже для больных с одинаковой стадией заболевания. Поэтому крайне важно учитывать такой важный прогностический фактор, как ВПЧ для выбора оптимального способа лечения больных с диагнозом РШМ.

Ключевые слова: рак шейки матки, вирус папилломы человека, высокий канцерогенный риск, вирусная нагрузка, выживаемость, прогноз.

Адрес для переписки:

Ибрагимова Марина Константиновна
634009, Россия, г. Томск, Кооперативный пер., 5,
НИИ онкологии Томского НИМЦ.
Тел.: 8 909 548-16-36 (моб.).
E-mail: lmk1805@yandex.ru

Contacts:

Marina K. Ibragimova
634009, Russian Federation, Tomsk, Kooperativnii lane, 5,
Cancer Research Institute, Tomsk NRMС.
Phone: +7 909 548-16-36 (mobile).
E-mail: lmk1805@yandex.ru

Библиографическое описание:

Ибрагимова М.К., Цыганов М.М., Чуруксаева О.Н., Коломиец Л.А., Литвяков Н.В. Анализ выживаемости больных ВПЧ-ассоциированным и ВПЧ-негативным раком шейки матки // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 3–4. С. 595–599. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-595-599

Citation:

Ibragimova M.K., Tsyganov M.M., Churuksaeva O.N., Kolomiets L.A., Litviakov N.V. Assessing survival rate of HPV-positive and HPV-negative cervical cancer patients // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 3–4, pp. 595–599. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-595-599

ASSESSING SURVIVAL RATE OF HPV-POSITIVE AND HPV-NEGATIVE CERVICAL CANCER PATIENTSIbragimova M.K.^{a,b}, Tsyganov M.M.^a, Churuksaeva O.N.^a, Kolomiets L.A.^{a,c}, Litviakov N.V.^{a,b}^a Cancer Research Institute "Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences", Tomsk, Russian Federation^b National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation^c Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Abstract. Currently, studies highlighting features of emergence, development, clinical score and prognosis for patients with HPV-negative cervical cancer are scarce. However, the data regarding high recurrence rate and mortality in patients with HPV-negative head and neck cancer are demonstrated. Here, cervical canal and exocervical scraping samples collected from 116 patients with primary cervical cancer, I–IV stages, aged 24 to 79 years, were examined with real-time PCR assay for assessing prevalence of 12 high oncogenic risk human papillomavirus (HPV) strains, genotyping and viral load. It was found that 84 (72.4%) and 32 cervical cancer patients (27.6%) were positive and negative, respectively, for high oncogenic risk (HR) HPV strains. Based on these data, patients were further subdivided into two groups: HPV-positive and HPV-negative patient group. Genotyping HPV-positive samples revealed that HPV genotype 16 was found in 67.8% of cases that agrees with data published worldwide. In addition, relapse-free and overall survival (HPV-positive and HPV-negative patients) rate were also evaluated in both groups. It was demonstrated that survival rate was significantly decreased in HPV-negative cervical cancer patients additionally characterized by less favorable prognosis. Moreover, length of relapse-free survival as well as overall survival for HPV-positive vs. HPV-negative patients was 102 vs. 68 months as well as 52 vs. 83 months, respectively. On the other hand, it was demonstrated that recurrence rate, clinical score and progression of cervical cancer directly depend on cancer spread observed at primary medical examination. Of note, the majority of primary cervical cancer relapses are diagnosed within the first 2 years after completing treatment. In addition, an increasing relapse rate has been documented in cervical cancer patients at advanced stages. Upon that, biological cancer behavior remains poorly predictable even in patients at similar disease stage. Therefore, it is essential that HPV as an important prognostic factor would be taken into account for choosing proper therapeutic strategy for treatment of patients with cervical cancer.

Key words: cervical cancer, human papillomavirus, high carcinogenic risk, viral load, survival, prognosis.

Введение

В настоящее время вирус папилломы человека (ВПЧ) является основным этиологическим фактором в развитии рака шейки матки (РШМ) [9] [Bosch, 2011 #133][Bosch, 2011 #60]. По данным различных исследований до 80–90% больных РШМ являются носителями ВПЧ высокого канцерогенного риска (ВКР) [4], соответственно, в 20% случаев ДНК опухоли шейки матки не содержит вируса. Это дает основание предполагать, что незначительное число опухолей могут возникать без участия данной группы вирусов (или вирус элиминируется в процессе канцерогенеза), то есть являются ВПЧ-негативными. Есть мнение, что обнаружение данного подтипа РШМ, не ассоциированного с наличием вируса, возможно лишь при наличии погрешностей при проведении лабораторных исследований [8]. Есть и другой взгляд на данный феномен — ВПЧ-негативные опухоли не только возникают наряду с ВПЧ-ассоциированным РШМ, но и принадлежат к более агрессивной группе и их канцерогенез существенно отличается от механизма развития ВПЧ-положительных опухолей [3].

На опухолях области головы и шеи было показано, что ВПЧ-негативные опухоли имеют более высокую частоту рецидивов и смертности, чем ВПЧ-положительные опухоли [10, 12, 15]. Аналогичные результаты были получены для больных с опухолью ануса. В группе ВПЧ16-положительных пациентов, по сравнению с ВПЧ16-негативными больными, наблюдалась высокая 4-летняя безрецидивная выживаемость (63,1% против 15,6%, $p < 0,001$)

и общая выживаемость (84,6% против 39,8%, $p = 0,008$) [7]. Работ, которые бы освещали проблему механизмов канцерогенеза ВПЧ-отрицательных опухолей шейки матки, их ответа на противоопухолевую терапию, выявление особенностей в возникновении рецидивов и выживаемость таких пациенток, крайне мало и такого рода исследования являются на сегодняшний день актуальными.

Цель работы: оценка безрецидивной и общей выживаемости ВПЧ-положительных и ВПЧ-негативных больных первичным РШМ.

Материалы и методы

В исследование было включено 116 жительниц Томской области в возрасте от 24 до 79 лет с первичным РШМ I–IVa стадий, проходивших обследование и лечение в Томском НИИ онкологии. Диагноз верифицирован гистологически, опухоли были охарактеризованы в соответствии с классификацией FIGO (классификация Международной федерации акушеров и гинекологов). Комплексное обследование включало гинекологический осмотр, кольпоскопию, цитологическое и гистологическое исследование, что позволило верифицировать диагноз. В стандартную схему лечения входило проведение неоадьювантной химиотерапии по схеме гемзар-цисплатин (2 курса), операции в объеме расширенной экстирпации матки с придатками или без, и лучевой терапии — дистанционная ЛТ с СОД 46 Гр или внутриволостная ЛТ с СОД 50 Гр.

Настоящее исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией 1964 г. (по-

следние изменения внесены на 64 Генеральной Ассамблее ВМА, Форталеза, Бразилия, октябрь 2013 г.), получено разрешение локального этического комитета НИИ онкологии Томского НИМЦ (протокол № 1, от 15 января 2010 г.). Всеми пациентами было подписано информированное согласие.

Материалом для исследования служили соскобы эпителия цервикального канала и наружной части шейки матки.

Выявление и генотипирование ДНК ВПЧ проводили методом PCR в режиме реального времени на приборе RotorGene 6000 (Corbett Research, Австралия) с использованием комплектов реагентов фирмы «Amplisens®» («АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-FL», кат# R-V31-T-4x (RG,iQ,Mx); «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-FL», кат# R-V25(RG,iQ,Mx) (Москва, Россия). Определяли наличие ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59 генотипов. Значение вирусной нагрузки рассчитывалось в геномных эквивалентах ДНК ВПЧ/10⁵ клеток, порог релевантного количества вируса принимался равным 3 lg ДНК ВПЧ/10⁵ клеток в соскобе.

Для оценки статистической значимости различий в распределении частот качественных признаков между группами использовали критерий Фишера. Оценку выживаемости проводили по методу Каплана–Майера.

Результаты и обсуждение

Наличие ВПЧ-положительного РШМ, ассоциированного с одним или одновременно с несколькими типами ВПЧ, было обнаружено у 84 пациенток (72,4%) и у 32 больных (27,6%) ВПЧ в опухоли выявлен не был. У ВПЧ-негативных пациентов была проведена повторная процедура забора материала, выделения ДНК и выявления и генотипирования ДНК ВПЧ в исследуемых образцах. В результате было подтверждено отсутствие искомым вирусом.

В зависимости от инфицированности ВПЧ, женщины были разделены на 2 группы наблюдения:

- группа 1 — ВПЧ-положительные женщины (n = 84), средний возраст 42,1±1,7 лет;
- группа 2 — ВПЧ-негативные женщины (n = 32), средний возраст 45,5±1,6 лет.

Группы не различались по основным клинико-патологическим показателям: размеру опухоли, лимфогенному метастазированию, гистотипу, стадии заболевания, репродуктивному анамнезу и сопутствующим гинекологическим патологиям (миома, эктропион/эрозия, воспалительные заболевания малого таза [ВЗМТ]) (данные не представлены).

Генотипирование ВПЧ-положительных образцов выявило, что 16 генотип ВПЧ встречается в 67,8% случаев. Это согласуется с литературными данными и полученными ранее результатами

[2, 16]. Второе и третье ранговое место занимают ВПЧ 33 и 31 типов (22,6 и 20,2% соответственно), в то время как, согласно литературным данным, во многих регионах мира ВПЧ 18 типа занимает по распространению второе место [16]. При определении вирусной нагрузки (концентрации ДНК вируса) в исследуемых образцах было показано, что количество пациенток с показателем низкой вирусной нагрузки (< 3 lg ДНК ВПЧ/10⁵ клеток), для которой показана слабая связь с риском развития РШМ [17], в группе обследуемых женщин составило 22,6%, при этом показатель высокой (клинически значимой) вирусной нагрузки (> 3 lg ДНК ВПЧ/10⁵ клеток), для которого показан высокий уровень корреляции с риском возникновения РШМ, составил 77,4%. На сегодняшний день установлено, что концентрация (вирусная нагрузка) ДНК ВПЧ может отражать тяжесть и прогноз течения папилломавирусной инфекции. При правильном и стандартизованном заборе клинического материала вирусная нагрузка менее 10⁵ геномных эквивалентов (ГЭ) ВПЧ ВКР в соскобе или 10³ ГЭ приходящихся на 10⁵ клеток человека считается клинически мало значимой, так как практически не встречается при тяжелой дисплазии и РШМ и ассоциирована с минимальным риском их развития. Напротив, количество вируса более 10⁵ ГЭ, приходящихся на 10⁵ клеток, обозначается, как повышенная нагрузка, ассоциировано с более высоким риском развития тяжелой дисплазии и чаще встречается при РШМ. Наконец, определенный смысл имеет и мониторинг вирусной нагрузки. Считается, что снижение количества ДНК ВПЧ более чем на 1 lg может являться маркером транзитной инфекции. При этом рост вирусной нагрузки через 3, 6 и 9 месяцев после проведенного лечения свидетельствует о возможности рецидива [18, 19].

При исследовании выживаемости в группах было обнаружено снижение как общей, так и безрецидивной выживаемости больных РШМ в группе ВПЧ-отрицательных пациенток. На рисунках 1 и 2 представлена безрецидивная и общая выживаемость больных РШМ: сроки наблюдения безрецидивной выживаемости для групп ВПЧ-положительных и ВПЧ-отрицательных пациенток оставили 102 и 68 месяцев, общей — 52 и 83 месяца соответственно. Двухлетняя безрецидивная выживаемость в данных группах составила 92 и 73%, общая — 86 и 65%.

Можно полагать, что преобладание среди ВПЧ-отрицательных РШМ более агрессивных форм неслучайно и снижение выживаемости таких пациенток может быть обусловлено иными механизмами канцерогенеза РШМ, что может объяснять причину различий в исходе заболевания. В работе Nagima Y. и соавт. было показано, что ВПЧ-негативные опухоли — отдельная группа и именно этот подтип наиболее плохо поддается действию лучевой терапии [13]. Еще в 2006 г. появилось сообщение об исследовании вирусной

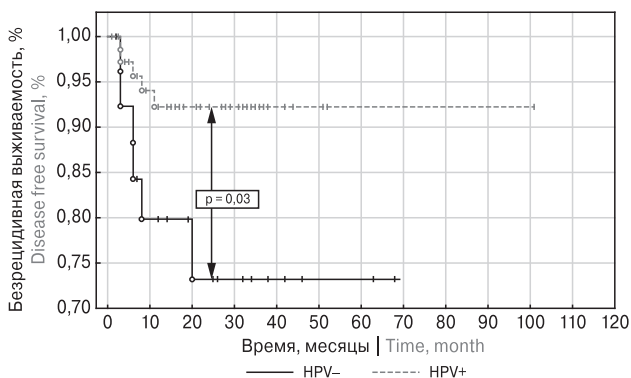


Рисунок 1. Безрецидивная выживаемость больных РШМ

Figure 1. Disease-free survival of patients with cervical cancer

нагрузки ВПЧ в соскобах эпителиальных клеток шейки матки больных РШМ до лечения. Было показано, что по степени тяжести прогноза заболевания РШМ находятся в следующей иерархии: ВПЧ-положительные опухоли с высокой вирусной нагрузкой, ВПЧ-положительные опухоли с низкой вирусной нагрузкой и наиболее плохой прогноз у ВПЧ-негативных опухолей [11].

В настоящее время показано, что частота рецидивирования, течение и прогрессирование РШМ находятся в прямой зависимости от распространенности злокачественного процесса на момент первичного обращения. Большая часть рецидивов РШМ диагностируется в течение первых 2 лет после окончания лечения. Согласно данным литературы, прослеживается увеличение частоты возникновения рецидивов при IV (43,5%) и III (29,1%) стадиях заболевания. Реже диагностируются рецидивы при II (21,3%) и I (8,3%) стадиях. Наиболее часто, в 62,3% случаев рецидивы рака шейки матки возникали в первые полтора года после завершения лечения пер-

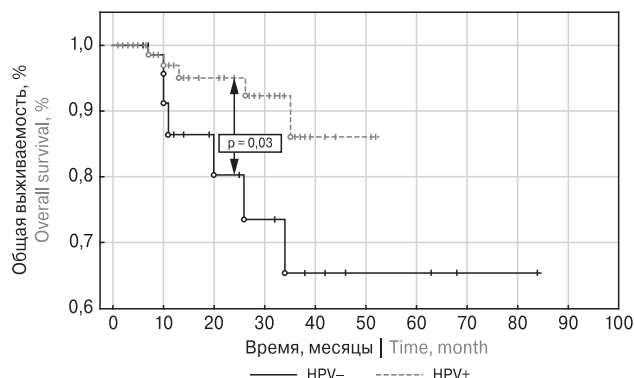


Рисунок 2. Общая выживаемость больных РШМ

Figure 2. Overall survival of patients with cervical cancer

вичной опухоли, при этом в сроки от 19 до 24 месяцев возникновение рецидива отмечено у 20,3% пациенток [1].

Однако биологическое поведение опухолей остается в достаточной степени непредсказуемым даже для больных с одинаковой стадией заболевания. Поэтому для определения характера течения заболевания, выбора оптимального способа лечения первичной опухоли шейки матки и прогнозирования риска возникновения рецидива заболевания крайне важно учитывать такой прогностический фактор, как наличие или отсутствие ВПЧ.

Заключение

ВПЧ-негативные опухоли шейки матки встречаются в 2,5 раза реже, чем ВПЧ-положительные, но имеют значительно худший прогноз. Определение наличия/отсутствия ДНК ВПЧ в опухоли может быть независимым прогностическим фактором для РШМ.

Список литературы/References

1. Гуськова Е.А., Неродо Г.А., Гуськова Н.К., Порываев Ю.А., Черникова Н.В. Факторы, влияющие на частоту рецидивирования рака шейки матки // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2015. № 10. С. 87–91. [Guskova E.A., Nerodo G.A., Guskova N.K., Poryvaev Yu.A., Chernikova N.V. Factors affecting the frequency of recurrence of cervical cancer. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy = International Journal of Applied and Fundamental Research*, 2015, vol. 10, pp. 87–91. (In Russ.)]
2. Коломиец Л.А., Чуруксаева О.Н., Шpileва О.В., Уразова Л.Н., Родичева Н.С. Особенности распространения различных типов вирусов папилломы человека (ВПЧ) у пациенток с цервикальными неоплазиями и раком шейки матки в г. Томске // Сибирский онкологический журнал. 2012. Т. 3, № 51. С. 41–45. [Kolomiets L.A., Churuksaeva O.N., Shpileva O.V., Urazova L.N., Rodicheva N.S. Prevalence of various human papillomavirus (HPV) types in patients with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and cervical cancer in Tomsk region. *Sibirskiy onkologicheskiy zhurnal = Siberian Journal of Oncology*, 2012, vol. 3, no. 41, pp. 41–45. doi: 10.17650/1994-4098-2009-0-3-4-78-83 (In Russ.)]
3. Комарова Л.Е. Современные аспекты цитологического скрининга рака шейки матки: обзор // Опухоли женской репродуктивной системы. 2009. № 3–4. С. 78–82. [Komarova L.E. Current aspects of cytological screening for cancer of the cervix uteri: a review. *Opukholi zhenskoy reproductivnoy sistemy = Tumors of Female Reproductive System*, 2009, no. 3–4, pp. 78–82. doi: 10.17650/1994-4098-2009-0-3-4-78-83 (In Russ.)]
4. Назарова Н.М., Прилепская В.Н., Суламанидзе Л.А., Мзарелуа Г., Бестаева Н. Папилломавирусная инфекция: распространенность, диагностика и лечение (обзор литературы). Лечащий врач. 2013. № 11. С. 15–19. [Nazarova N.M., Prilepskaya V.N., Sulamanidze L.A., Mzarelua G., Bestaeva N. Human papillomavirus infection: incidence, diagnosis and treatment (the literature review). *Lechashchiy vrach = The Attending Doctor*, 2013, no. 11, pp. 15–19. (In Russ.)]
5. Уразова Л.Н., Мерзлякова М.К., Никитина Е.Г., Писарева Л.Ф., Коломиец Л.А., Чуруксаева О.Н., Шивит-оол А.А. Сравнительное изучение уровня инфицированности вирусом папилломы человека высокого онкогенного риска

- женского населения Томской области и Республики Тыва // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2012. № 6. С. 15–20. [Urazova L.N., Merzlyakova M.K., Nikitina E.G., Pisareva L.F., Kolomiets L.A., Churuksaeva O.N., Shivit-Ool A.A. Comparative study of incidence of high-risk human papillomavirus infection among females of the Tyva Republic. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccine Prophylaxis*, 2012, no. 6, pp. 15–20. (In Russ.)]
6. Чуруксаева О.Н., Коломиец Л.А. Онкотропная папилломавирусная инфекция и прогноз течения рака шейки матки // Сибирский онкологический журнал. 2013. № 1. С. 82–87. [Churuksaeva O.N., Kolomiets L.A. Oncotropic papillomavirus infection and prognosis for patients with cervical cancer. *Sibirskiy onkologicheskij zhurnal = Siberian Journal of Oncology*, 2013, no. 1, pp. 82–87. (In Russ.)]
 7. Шахтактинская Ф.Ч., Намазова-Баранова Л.С., Таточенко В.К., Новикова Д.А., Ткаченко Н.Е. Вирус папилломы человека. Профилактика ВПЧ-ассоциированных заболеваний // Педиатрическая фармакология. 2015. Т. 12, № 1. С. 74–78. [Shakhtaktinskaya F.C., Namazova-Baranova L.S., Tatchenko V.K., Novikova D.A., Tkachenko N.E. Human papilloma virus. Prevention of HPV-associated diseases. *Pediatricheskaya farmakologiya = Pediatric Pharmacology*, 2015, vol. 12, no. 1, pp. 74–78. (In Russ.)]
 8. Böhmer, G., van den Brule A.J., Brummer O., Meijer C.L., Petry K.U. No confirmed case of human papillomavirus DNA-negative cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or invasive primary cancer of the uterine cervix among 511 patients. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2003, no. 189, pp. 118–120. doi: 10.1067/mob.2003.439
 9. Bosch F.X. Human papillomavirus: science and technologies for the elimination of cervical cancer. *Expert Opin. Pharmacother.*, 2011, no. 12, pp. 2189–2204. doi: 10.1517/14656566.2011.596527
 10. Dahlgren L., Dahlstrand H., Lindquist D., Högmo A., Björnestrål L., Lindholm J., Lundberg B., Dalianis T., Munck-Wikland E. Human papillomavirus is more common in base of tongue than in mobile tongue cancer and is a favorable prognostic factor in base of tongue cancer patients. *Int. J. Cancer.*, 2004, no. 112, pp. 1015–1019. doi: 10.1002/ijc.20490
 11. Datta N.R., Kumar P., Singh S., Gupta D., Srivastava A., Dhole T.N. Does pretreatment human papillomavirus (HPV) titers predict radiation response and survival outcomes in cancer cervix? A pilot study. *Gynecol. Oncol.*, 2006, no. 103, pp. 100–105. doi: 10.1016/j.ygyno.2006.01.058
 12. Fakhry C., Westra W.H., Li S., Cmelak A., Ridge J.A., Pinto H., Forastiere A., Gillison M.L. Improved survival of patients with human papillomavirus–positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2008, no. 100, pp. 261–269. doi: 10.1093/jnci/djn011
 13. Harima Y., Sawada S., Nagata K., Sougawa M., Ohnishi T. Human papilloma virus (HPV) DNA associated with prognosis of cervical cancer after radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2002, no. 52, pp. 1345–1351. doi: 10.1016/S0360-3016(01)02796-1
 14. Lassen P., Eriksen J.G., Hamilton-Dutoit S., Tramm T., Alsner J., Overgaard J. Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J. Clin. Oncol.*, 2009, no. 27, pp. 1992–1998. doi: 10.1200/JCO.2008.20.2853
 15. Licitra L., Perrone F., Bossi P., Suardi S., Mariani L., Artusi R., Oggionni M., Rossini C., Cantù G., Squadrelli M. High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, 2006, no. 24, pp. 5630–5636. doi: 10.1200/JCO.2005.04.6136
 16. Munoz N., Bosch F.X., de Sanjose S., Herrero R., Castellsagué X., Shah K.V., Snijders P.J., Meijer C.J. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2003, no. 348, pp. 518–527. doi: 10.1056/NEJMoa021641
 17. Sasieni P., Castanon A., Cuzick J. Effectiveness of cervical screening with age: population based case-control study of prospectively recorded data. *BMJ*, no. 339: b2968. doi: 10.1136/bmj.b2968
 18. Snijders P.J., Verhoef V.M., Arbyn M., Ogilvie G., Minozzi S., Banzi R., van Kemenade F.J., Heideman D.A., Meijer C.J. High-risk HPV testing on self-sampled versus clinician-collected specimens: a review on the clinical accuracy and impact on population attendance in cervical cancer screening. *Int. J. Cancer*, 2013, no. 132, pp. 2223–2236. doi: 10.1002/ijc.27790
 19. Steenbergen R.D., Snijders P.J., Heideman D.A., Meijer C.J. Clinical implications of (epi) genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions. *Nat. Rev. Cancer*, 2014, no. 14, pp. 395–405. doi: 10.1038/nrc3728

Авторы:

Ибрагимова М.К., младший научный сотрудник лаборатории онковирусологии НИИ онкологии ФГБНУ Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН (НИИ онкологии Томского НИМЦ), г. Томск, Россия; аспирант кафедры физиологии человека и животных Института биологии, экологии, почвоведения сельского и лесного хозяйства ФГАУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», г. Томск, Россия;

Цыганов М.М., к.б.н, научный сотрудник лаборатории онковирусологии НИИ онкологии Томского НИМЦ, г. Томск, Россия;

Чуруксаева О.Н., д.м.н, старший научный сотрудник отдела гинекологии НИИ онкологии Томского НИМЦ, г. Томск, Россия;

Коломиец Л.А., д.м.н, профессор, зав. отделением гинекологии НИИ онкологии Томского НИМЦ, г. Томск, Россия; профессор кафедры онкологии ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Томск, Россия;

Литвяков Н.В., д.б.н, зав. лабораторией онковирусологии НИИ онкологии Томского НИМЦ, г. Томск, Россия; доцент кафедры физиологии человека и животных Института биологии, экологии, почвоведения сельского и лесного хозяйства ФГАУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», г. Томск, Россия.

Поступила в редакцию 13.03.2019
Принята к печати 22.05.2019

Authors:

Ibragimova M.K., Junior Researcher, Laboratory of Oncovirology Cancer Research Institute Tomsk NRMС, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk NRMС), Tomsk, Russian Federation; Graduate Student, Department of Human and Animal Physiology Institute of Biology, Ecology, Soil Science of Agriculture and Forestry, National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation;

Tsyganov M.M., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Oncovirology, Cancer Research Institute Tomsk NRMС, Tomsk, Russian Federation;

Churuksaeva O.N., PhD, MD (Medicine), Senior Researcher, Department of Gynecology, Cancer Research Institute Tomsk NRMС, Tomsk, Russian Federation;

Kolomiets L.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Gynecology, Cancer Research Institute Tomsk NRMС, Tomsk, Russian Federation; Professor of the Department of Oncology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation;

Litviakov N.V., PhD, MD (Biology), Head of the Laboratory of Oncovirology, Cancer Research Institute Tomsk NRMС, Tomsk, Russian Federation; Associate Professor, Department of Human and Animal Physiology, Institute of Biology, Ecology, Soil Science of Agriculture and Forestry, National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation.

Received 13.03.2019
Accepted 22.05.2019

МОНИТОРИНГ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ МЕТОДОМ МИКРОЯДЕРНОГО АНАЛИЗА КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ КЛЕЩЕВЫМ ЭНЦЕФАЛИТОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЛИЧИЯ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗЫ

Н.Н. Ильинских^{1,2}, Е.Н. Ильинских^{1,2}, Е.В. Замятина¹, С.В. Ли¹

¹ ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, Россия

² ФГАОУ ВО Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск, Россия

Резюме. Цель работы состояла в оценке динамики частоты встречаемости цитокинез-блокированных Т-лимфоцитов с микроядрами в периферической крови и клеток буккального эпителия с микроядрами в течение полугодия у больных острым клещевым энцефалитом в зависимости от носительства функционирующих и нефункционирующих вариантов генов глутатион-S-трансферазы (*GSTM1* или *GSTT1*) в генотипе больного. С использованием микроядерного анализа в иммунокомпетентных и не иммунокомпетентных клетках было проведено обследование 54 больных острым клещевым энцефалитом и 35 здоровых лиц (контроль), проживающих в Томской и Тюменской областях. В случае анализа частоты бинуклеарных цитокинез-блокированных Т-лимфоцитов с микроядрами материалом для получения фитогемагглютинин-стимулированных культур послужила венозная периферическая кровь, а с целью изучения числа буккальных клеток с микроядрами в качестве материала использовали соскобы эпителиальных клеток слизистой оболочки щек. Для обоих методик микроядерного теста получали цитологические препараты, которые окрашивали по методам Гимзе или Фельгена. Исследование проводили в динамике при госпитализации, а также через 1 неделю, 1, 3 и 6 месяцев. Для анализа вариантов генов *GSTM1* и *GSTT1* использовали полимеразную цепную реакцию. Результаты анализа показали существенное повышение частоты клеток с микроядрами у больных клещевым энцефалитом по сравнению с контролем, при этом уровни частоты встречаемости цитокинез-блокированных Т-лимфоцитов с микроядрами были существенно выше по сравнению с клетками буккального эпителия с микроядрами. Наиболее значительное и длительное повышение частоты клеток с микроядрами было связано с мутантными нефункционирующими вариантами генов *GSTM1(0/0)* и *GSTT1(0/0)*. При наличии у больного неактивных форм этих генов цитогенетическая нестабильность в цитокинез-блокированных Т-лимфоцитах крови могла сохраняться на протяжении до полугодия. В буккальном эпителии нормализация частоты клеток с микроядрами была установлена уже через 1–3 месяца после лечения. **Вывод.** Установлено, что наиболее выраженное и длительное сохранение повышенной частоты клеток с цитогенетическими на-

Адрес для переписки:

Ильинских Николай Николаевич
634050, Россия, г. Томск-50, а/я 808.
Тел.: 8 909 540-86-17.
E-mail: nauka-tomsk@yandex.ru

Contacts:

Nikolay N. Ilyinskikh
634050, Russian Federation, Tomsk-50, POB 808.
Phone: +7 909 540-86-17.
E-mail: nauka-tomsk@yandex.ru

Библиографическое описание:

Ильинских Н.Н., Ильинских Е.Н., Замятина Е.В., Ли С.В. Мониторинг цитогенетической нестабильности методом микроядерного анализа клеток у больных клещевым энцефалитом в зависимости от наличия вариантов генов глутатион-S-трансферазы // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 3–4. С. 600–606. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-600-606

Citation:

Ilyinskikh N.N., Ilyinskikh E.N., Zamyatina E.V., Li S.V. Monitoring cytogenetic instability by micronucleus assay of immunocompetent and non-immunocompetent cells in patients with tick-borne encephalitis depending on glutathione-S-transferase genes genotype variants // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 3–4, pp. 600–606. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-600-606

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ (№ 16-40-700149).

рушениями наблюдалось в цитокинез-блокированных Т-лимфоцитах периферической крови больных клещевым энцефалитом, являющихся носителями генотипа с неактивными аллелями двух генов глутатион-S-трансферазы *GSTM1*(0/0) и *GSTT1*(0/0).

Ключевые слова: клещевой энцефалит, микроядерный анализ, буккальный эпителий, цитокинез-блокированные лимфоциты, *GSTM1*, *GSTT1*.

MONITORING CYTOGENETIC INSTABILITY BY MICRONUCLEUS ASSAY OF CELLS IN PATIENTS WITH TICK-BORNE ENCEPHALITIS DEPENDING ON GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE GENES GENOTYPE VARIANTS

Ilyinskikh N.N.^{a,b}, Ilyinskikh E.N.^{a,b}, Zamyatina E.V.^a, Li S.V.^a

^a Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

^b National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

Abstract. Our study was aimed at assessing dynamic changes in frequency of micronuclei-bearing cytokinesis-blocked T cells in peripheral blood as well as buccal micronucleated epithelial cells during a six month follow-up in patients with acute tick-borne encephalitis, carriers of active and inactive glutathione-S-transferase gene (*GSTM1* and *GSTT1*) variants. Micronucleus assay was used to examine immunocompetent and non-immunocompetent cells isolated from 54 patients with acute tick-borne encephalitis and 35 healthy volunteers (control) residing in the Tomsk and Tyumen regions. Analyzing frequency of cytokinesis-blocked micronucleated T cells was performed by using venous peripheral blood for running phytohemagglutinin-stimulated cell cultures as well as examining percentage of buccal micronucleated cells collected by scraping buccal mucous membrane epithelial cells. Both techniques of micronucleus assay were conducted by preparing cytology slides stained according to Giemsa or Felgen method. Samples were dynamically investigated on hospital admission as well as at week 1, month 1, 3 and 6. Polymerase chain reaction was used to analyze prevalence of *GSTM1* and *GSTT1* gene alleles. The data obtained revealed a significantly increased frequency of micronucleated cells in tick-borne encephalitis patients compared to control group. In addition, percentage of cytokinesis-blocked micronucleated T cells was significantly higher than that of micronucleated buccal cells. Moreover, most prominent and long-lasting increase in frequency of micronucleated cells was associated with mutant inactive *GSTM1*(0/0) and *GSTT1*(0/0) gene variants. Patients carrying inactive genes variants were found to exhibit cytogenetic instability in cytokinesis-blocked blood T cells maintained for up to six months. In contrast, frequency of buccal micronucleated cells was close to the level in control group and detected as early as 1-3 months after completing therapy. Therefore, it was found that the prominent long-lasting frequency of cytogenetically unstable cells was observed in cytokinesis-blocked T cells in peripheral blood samples from patients with tick-borne encephalitis carrying inactive variants both of *GSTM1*(0/0) and *GSTT1*(0/0) glutathione-S-transferase genes.

Key words: tick-borne encephalitis, micronucleus analysis, buccal cells, cytokinesis-block lymphocytes, *GSTM1*, *GSTT1*.

Нами впервые было установлено, что вирус клещевого энцефалита (КЭ) в условиях *in vitro*, а также у больных людей *in vivo* способен индуцировать значительное повышение числа Т-лимфоцитов с абберациями в числе и структуре хромосом [2, 3, 14]. Поскольку известно, что в результате иммунного ответа при различных инфекционных заболеваниях, включая КЭ, клетки иммунной системы активно продуцируют реактивные формы кислорода и азота, которые могут повреждать ДНК и индуцировать генные и хромосомные мутации [1, 3], то можно предположить, что повышение частоты цитогенетических нарушений у больных КЭ связано с оксидативным стрессом, который приводит к повреждению хромосом в различных соматических клетках. Однако анализ цитогенетических нарушений в других типах клеток, кроме иммунокомпетентных, например, эпителиальных, у больных КЭ еще не проводился.

Глутатион-S-трансферазы способствуют защите организма от широкого круга химичес-

ких соединений, включая реактивные формы кислорода и другие потенциальные мутагены. Имеются исследования, свидетельствующие о связи между тяжестью инфекционного заболевания и наличием у больного мутантных аллелей генов ферментов глутатион-S-трансфераз [5, 7, 12, 15]. Установлено, что носительство мутантных неактивных вариантов генов *GSTM1* и *GSTT1* часто сопровождается цитогенетической нестабильностью и повышенной чувствительностью хромосомного аппарата человека к различным мутагенным факторам [16, 18].

Цель настоящего исследования заключалась в изучении динамики частоты встречаемости цитокинез-блокированных Т-лимфоцитов с микроядрами (МЯ) в периферической крови и частоты клеток буккального эпителия с МЯ в течение полугода у больных острым клещевым энцефалитом (КЭ) в зависимости от носительства активных и неактивных вариантов генов глутатион-S-трансферазы (*GSTM1* или *GSTT1*) в генотипе больного.

Материалы и методы

В исследование были включены 54 больных лихорадочной формой острого КЭ (возраст $38,3 \pm 4,3$ лет) и 35 здоровых лиц (возраст $36,9 \pm 3,7$ лет), сопоставимых по возрасту и полу, проживающих в г. Томске, а также в Томской и Тюменской областях, которые были обследованы с использованием рутинных клинико-лабораторных и цитогенетических методов — микроядерного анализа в клетках буккального эпителия и в бинуклеарных цитокинез-блокированных Т-лимфоцитах периферической крови [3, 10, 11]. Диагноз КЭ был поставлен на основании клинико-эпидемиологических данных, включая сведения об укусах клещей, и подтвержден с помощью метода иммуноферментного анализа (ИФА) на антиген вируса КЭ, а также на иммуноглобулины классов М и G к этому вирусу (ЗАО «Вектор-Бест», Россия). С использованием ИФА иммуноглобулинов классов М и G к боррелиям иксодового клещевого боррелиоза (ЗАО «Вектор-Бест», Россия) у всех больных было исключено это заболевание. Обследование больных проводилось на базе инфекционной клиники ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ) МЗ РФ и инфекционных отделений ОГАУЗ Городская клиническая больница № 3 им. Б.И. Альперовича г. Томска, а также районных больниц Томской и Тюменской областей.

Исследование было одобрено Этическим комитетом СибГМУ (протокол № 4308 от 19.10.2015 г.), проводилось в соответствии с правилами «О порядке проведения биомедицинских исследований у человека» (2002 г.) и «Правилами клинической практики в РФ» (Приказ Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003 г.). Больные до госпитализации не получали лекарственной терапии и не подвергались рентгенологическим методам обследования. Все обследованные лица подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании и получения от них биологического материала (проб крови и буккального эпителия).

Материал для исследования (пробы клеток буккального эпителия и периферической крови для получения культур Т-лимфоцитов) был получен в динамике при госпитализации в стационар, а также спустя 1 неделю, 1, 3 и 6 месяцев в острый и реконвалесцентный периоды болезни. Цитологические препараты клеток буккального эпителия получали с помощью двух одноразовых стерильных шпателей, делая соскобы со слизистой оболочки левой и правой щек выше линии смыкания зубов [3]. Полученные таким образом пробы буккальных клеток помещали в два контейнера, помеченных «левая щека» и «правая щека», которые содержали фиксатор Саккоманно (Diapath, Италия) [10, 11]. Суспензию клеток трижды центрифугировали

с последующим добавлением к осадку буферного раствора с pH 7,0, содержащего 1,6 г/л трис-HCl, 38,0 г/л тетранатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и 1,2 г/л хлорида натрия, растворенных в деионизированной стерильной воде. Клетки фиксировали с помощью смеси этанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1 и с помощью пипетки наносили на чистые и высушенные предметные стекла [10, 11]. Полученные препараты окрашивали по методу Фельгина и анализировали частоту клеток с МЯ в не менее чем 1000 эпителиоцитах в соответствии со стандартной методикой [10, 11].

Культуры мононуклеарных клеток получали *in vitro* инкубируя во флаконах 0,3 мл гепаринизированной крови (около $1,0 \times 10^6$ клеток/мл) в 4,7 мл среды RPMI-1640 («ПанЭко», Москва, РФ) при 37°C в присутствии 5% CO₂. Цитогенетический анализ бинуклеарных цитокинез-блокированных Т-лимфоцитов в 72-часовых культурах мононуклеарных клеток проводился после добавления в начале инкубации 0,1 мл фитогемагглютинаина М (ФГА) при концентрации 10 мкг/мл в качестве стимулятора деления Т-лимфоцитов (ПанЭко, РФ), а также 100 мкл цитохалазина В (Sigma-Aldrich, США) при концентрации раствора 300 мкг/мл за 28 ч до конца культивирования в качестве цитокинез-блокирующего агента в соответствии со стандартной методикой [10, 11]. Для фиксации клеток использовали свежеприготовленную смесь абсолютного этанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 5:1. Цитологические препараты окрашивали по методу Гимзы и анализировали частоту клеток с МЯ не менее чем в 1000 бинуклеарных Т-лимфоцитов у каждого человека с помощью микроскопа «PrimoStar» (Carl Zeiss, Германия) при увеличении в 1000 раз [10, 11]. К основным критериям идентификации МЯ можно отнести следующие признаки: одинаковая структура и интенсивность окраски основных ядер и МЯ, диаметр МЯ варьировал от $1/16$ до $1/3$ диаметра одного из основных ядер, МЯ имели четкие границы и не были соединены с основными ядрами.

Известно, что гены *GSTM1* и *GSTT1* могут иметь относительно протяженные делеции, приводящие к утрате функционирования этих генов, которые обычно обозначают как «нулевые» аллели *GSTM1(0/0)* или *GSTT1(0/0)* [4, 8]. Такие мутации ассоциированы с отсутствием продукции соответствующих ферментов — глутатион-S-трансфераз. Делеционные варианты генов *GSTM1* (GenBank № X68676) и *GSTT1* (GenBank № AP000351) были идентифицированы в мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) [4, 8]. ДНК выделяли из проб клеток буккального эпителия согласно стандартному протоколу. В амплификационную пробу вносили две пары праймеров, что давало возможность одновременно амплифицировать фрагменты

каждого из указанных генов. В данной работе использовали амплификаторы «Терцик» (ДНК-Технология, РФ). Разделение продуктов амплификации и продуктов рестрикции ампликонов проводили в 3% агарозном геле, приготовленном на однократном трис-боратном буфере с добавлением бромистого этидия и визуализацией в проходящем ультрафиолетовом свете (длина волны 380 нм) с применением камеры для горизонтального электрофореза ЕС 12–13 (Биоком, Россия). Нормальные аллели генов, обозначенные знаком «+» характеризуются присутствием ПЦР-продуктов. Такие доноры могут быть либо гетерозиготны [$GSTM1(+/0)$ и $GSTT1(+/0)$], либо гомозиготны [$GSTM1(+/+)$ и $GSTT1(+/+)$] по нормальному активному аллелю. Мутантный генотип $GSTM1(0/0)$ или $GSTT1(0/0)$ означает отсутствие на электрофореграмме фрагментов размером 271 и 480 пар оснований, в результате чего данные индивидуумы гомозиготны по делеции и имеют резкое снижение активности соответствующего фермента [4, 8].

Статистическую обработку осуществляли с использованием пакета статистических программ Statistica v. 10 (StatSoft Inc., США). Частоты гаплотипов рассчитывали с помощью программы «The EH Software Program» (Rockefeller University, США). Все количественные показатели исследования обрабатывали с применением однофакторного дисперсионного анализа ANOVA и t-критерия Стьюдента для зависимых выборок, поскольку тестирование закона распределения при помощи критерия Колмогорова–Смирнова не выявило отличий от нормального. Различия сравниваемых результатов ($\bar{X} \pm s_x$, где \bar{X} — выборочное среднее, а s_x — стандартная ошибка) считались достоверными при достигнутом уровне значимости $p > 0,05$.

Результаты

Результаты показали существенные повышение частоты как клеток буккального эпителия с микроядрами, так и бинуклеарных Т-лимфоцитов периферической крови с МЯ у больных КЭ по сравнению с контролем (табл.). Наиболее значительное повышение частоты клеток с МЯ было установлено у больных — носителей мутантных аллелей генов $GSTM1(0/0)$ и $GSTT1(0/0)$ по сравнению с группой больных, имевших активные варианты этих генов $GSTM1(+)$ и $GSTT1(+)$. Так, например, при поступлении в стационар частота буккальных клеток с МЯ в группе больных КЭ, являвшихся носителями нулевых аллелей генов $GSTM1(0/0)$ и $GSTT1(0/0)$, была значимо выше ($5,11 \pm 0,18\%$), чем в группе больных с активными вариантами этих генов $GSTM1(+)/GSTT1(+)$ — $2,08 \pm 0,09\%$ ($p > 0,001$).

Частота цитокинез-блокированных Т-лимфоцитов периферической крови у больных КЭ, имевших в своем генотипе мутантные неактивные ал-

лели $GSTM1(0/0)$ и $GSTT1(0/0)$ ($8,08 \pm 0,21\%$), также была существенно выше, чем в группе больных с нормальными аллелями этих генов $GSTM1(+)$ и $GSTT1(+)$ ($2,92 \pm 0,11\%$, $p > 0,001$).

Аналогичные результаты были получены при сравнении частоты клеток с МЯ в буккальных клетках и Т-лимфоцитах между группами больных КЭ, имевших сочетание неактивной формы гена $GSTM1(0/0)$ и активного аллеля гена $GSTT1(+)$, и группами больных с активными вариантами обоих генов $GSTM1(+)/GSTT1(+)$ ($p > 0,001$). Вместе с тем достоверных отличий частоты эпителиальных и иммунокомпетентных клеток с микроядрами между группами больных КЭ с генотипами $GSTM1(+)/GSTT1(0/0)$ и $GSTM1(+)/GSTT1(+)$ обнаружено не было ($p > 0,05$).

Через неделю после курса терапии у больных КЭ было установлено существенное снижение частоты буккальных и лимфоцитарных клеток с микроядрами для всех четырех вариантов генотипов ($p > 0,001$). Однако значение этих показателей оставалось существенно выше, чем в группе здоровых лиц. В группе больных КЭ, имеющих неактивные варианты обоих генов $GSTM1(0/0)$ и $GSTT1(0/0)$, частота клеток буккального эпителия с микроядрами только через 3 месяца после курса лечения достоверно не отличалась от соответствующих показателей в контроле, а в группах больных КЭ, имеющих активную форму гена $GSTM1(+)$ снижение уровня клеток с микроядрами до сопоставимого со значениями в контрольной группе было отмечено уже через 1 месяц.

Несколько иной характер цитогенетических последствий отмечен в Т-лимфоцитах периферической крови. В группах больных КЭ, имеющих четыре варианта генотипа, частота клеток цитокинез-блокированных Т-лимфоцитов с МЯ становилась достоверно неотличимой от соответствующих показателей в контроле только через 6 месяца после курса лечения.

Обсуждение

Известно, что в результате инфекционного процесса при различных инфекционных заболеваниях, в том числе при КЭ, клетки иммунной системы активно продуцируют реактивные формы кислорода (ROS) и азота (RNS), такие как супероксид-ион радикал, перекись водорода, а также оксид азота и пероксинитрит [4, 17]. Установлено, что непропорционально высокая генерация этих высокореактивных соединений может повреждать клеточные макромолекулы, включая ДНК и ферменты [1, 17]. Таким образом, цитогенетические эффекты, которые обнаружены у больных КЭ, по-видимому, связаны с окислительным стрессом, вызванным внедрением инфекционного агента в организм и развитием иммунного ответа [1, 14]. Под влиянием реактивных форм кислорода в клетках происходит раз-

рушение тубулиновых волокон ахроматинового аппарата деления, что способствует аномальному расхождению хромосом в митозе и формированию МЯ в различных типах клеток, включая лимфоциты и буккальные клетки [3, 11].

Известно, что гены *GSTM1* и *GSTT1* кодируют класс ферментов глутатион-S-трансфераз, которые катализируют присоединение трипептида глутатиона к электрофильному центру разнообразных соединений, что приводит образованию более гидрофильных и менее токсичных продуктов [9]. Глутатион-S-трансферазы явля-

ются важной частью системы защиты от широкого круга потенциально опасных химических соединений и участвуют в реакциях детоксикации канцерогенных промежуточных продуктов, лекарственных препаратов, тяжелых металлов, полиароматических углеводородов, а также супероксид-анион радикала кислорода и продуктов перекисного окисления липидов [9]. Установлено, что полиморфизм генов глутатион-S-трансфераз может влиять на уровень повреждений ДНК, вызванных рядом мутагенных и/или канцерогенных соединений эндогенного и эк-

Таблица. Частота клеток с микроядрами в мазках буккального эпителия и в культурах цитокинез-блокированных Т-лимфоцитов периферической крови (%) больных клещевого энцефалитом в зависимости от носительства активных (+) или неактивных (0) вариантов генов глутатион-S-трансфераз *GSTM1* и *GSTT1* (\pm) в генотипе, полученных в динамике при госпитализации, через 1 неделю, 1, 3 и 6 месяцев

Table. The frequency of micronucleated cells in buccal cell smears and in cultures of cytokinesis-blocked peripheral blood T-lymphocytes (%) of tick-borne encephalitis patients, depending on the burden of active (+) or inactive (0) variants of *GSTM1* and *GSTT1* glutathione-S-transferase genes in the genotypes (\pm), obtained repeatedly during admission of patients to hospital, and also after 1 week, 1, 3 and 6 months

Типы клеток Types of cells	Группы Groups	Сочетания активных (+) или неактивных (0) вариантов генотипов <i>GSTM1/GSTT1</i> (%) Combinations of active (+) or inactive (0) variants of genotypes <i>GSTM1/GSTT1</i> (%)			
		<i>GSTM1</i> (0/0) <i>GSTT1</i> (0/0)	<i>GSTM1</i> (0/0) <i>GSTT1</i> (+)	<i>GSTM1</i> (+) <i>GSTT1</i> (0/0)	<i>GSTM1</i> (+) <i>GSTT1</i> (+)
Буккальные клетки Buccal cells	Здоровые доноры (контроль) Healthy donors (control)	0,26 \pm 0,05 n = 8	0,40 \pm 0,08 n = 9	0,31 \pm 0,04 n = 7	0,19 \pm 0,06 n = 11
	Больные 1-2 день госпитализации Patients 1 to 2 days after admission	*5,11 \pm 0,18 ^{##} n = 12	3,34 \pm 0,16 ^{##} n = 14	2,59 \pm 0,05 [#] n = 13	2,08 \pm 0,09 ^{^^} n = 15
	Через 1 неделю In a week	1,69 \pm 0,18 ^{##} n = 10	1,82 \pm 0,23 ^{##} n = 12	0,79 \pm 0,09 ^{##} n = 11	0,71 \pm 0,20 [^] n = 15
	Через 1 месяц In a month	0,69 \pm 0,05 ^{##} n = 10	0,59 \pm 0,06 n = 14	0,40 \pm 0,10 n = 10	0,21 \pm 0,04 n = 13
	Через 3 месяца In 3 months	0,41 \pm 0,08 n = 10	0,55 \pm 0,10 n = 12	0,32 \pm 0,05 n = 10	0,19 \pm 0,08 n = 11
	Через 6 месяцев In 6 months	0,38 \pm 0,03 n = 10	0,36 \pm 0,04 n = 11	0,32 \pm 0,03 n = 11	0,21 \pm 0,06 n = 11
Цитокинез-блокированные Т-лимфоциты периферической крови Cytokinesis-blocked peripheral blood T-lymphocytes	Здоровые доноры Healthy donors (control)	0,36 \pm 0,05 n = 10	0,34 \pm 0,06 n = 10	0,42 \pm 0,11 n = 10	0,24 \pm 0,06 n = 11
	Больные 1-2 день госпитализации Patients 1 to 2 days after admission	8,08 \pm 0,21 ^{##} n = 12	6,44 \pm 0,40 ^{##} n = 14	3,01 \pm 0,13 ^{^^} n = 13	2,92 \pm 0,11 ^{^^} n = 15
	Через 1 неделю In a week	6,32 \pm 0,43 ^{##} n = 10	4,56 \pm 0,18 ^{##} n = 12	2,86 \pm 0,19 ^{^^} n = 11	2,54 \pm 0,14 ^{^^} n = 13
	Через 1 месяц In a month	3,22 \pm 0,18 ^{##} n = 10	2,52 \pm 0,21 ^{^^} n = 14	2,08 \pm 0,15 ^{^^} n = 10	2,03 \pm 0,12 ^{^^} n = 13
	Через 3 месяца In 3 month	0,99 \pm 0,05 ^{##} n = 10	0,90 \pm 0,05 ^{##} n = 12	0,81 \pm 0,05 ^{^^} n = 10	0,70 \pm 0,05 ^{^^} n = 11
	Через 6 месяцев In 6 month	0,41 \pm 0,04 [#] n = 10	0,27 \pm 0,07 n = 11	0,32 \pm 0,04 n = 11	0,21 \pm 0,05 n = 10

Примечание. *Значимые отличия частоты клеток с микроядрами отмечены одним символом при $p < 0,05$ и двумя символами при $p < 0,01$: знаком (*) групп больных клещевым энцефалитом от контроля, а знаком (#) групп больных клещевым энцефалитом с генотипами *GSTM1*(0/0)/*GSTT1*(0/0), *GSTM1*(0/0)/*GSTT1*(+) или *GSTM1*(+)/*GSTT1*(0/0) от группы больных клещевым энцефалитом с активными вариантами обоих генов *GSTM1*(+)/*GSTT1*(+).

Note. *Significant differences in the frequency of micronucleated cells are marked with one symbol in case of $p < 0.05$ and two symbols in case of $p < 0.01$: the sign of (*) marks significant differences groups of tick-borne encephalitis patients as compared to the controls, and the sign (#) marks significant differences groups of the tick-borne encephalitis patients with genotypes *GSTM1*(0/0)/*GSTT1*(0/0), *GSTM1*(0/0)/*GSTT1*(+) or *GSTM1*(+)/*GSTT1*(0/0) as compared to the group of patients with active variants of both genes *GSTM1*(+)/*GSTT1*(+).

зогенного происхождения, и тесно связан с индивидуальной восприимчивостью к этим веществам [4, 8, 16]. Известно, что гены *GSTM1* и *GSTT1* могут иметь относительно протяженные делеции, приводящие к утрате функционирования этих генов, которые обычно обозначают как «нулевые» аллели *GSTM1(0/0)* или *GSTT1(0/0)* [4, 8]. Такие мутации ассоциированы с отсутствием продукции соответствующих ферментов, что приводит к значительному повышению повреждающего действия мутагенов, в том числе реактивных форм кислорода и оксида азота на ДНК. Встречаемость таких делеций в популяциях очень высока, поскольку установлено, что до половины европеоидного населения являются гомозиготами по делеции гена *GSTM1* и около 15% по делеции гена *GSTT1* [6, 13].

В настоящее время, показано, что полиморфизм генов *GSTM1* и *GSTT1*, связанный с делецией этих генов играет важную роль в повышенном риске не только некоторых типов рака [13, 19], но и более тяжелого течения инфекционных заболеваний, таких как туберкулез, малярия, ВИЧ-инфекция и геморрагическая лихорадка с почечным синдромом [5, 7, 12, 15].

Во многих исследованиях, доказана связь между носительством делеций *GSTM1* и/или

GSTT1 и значительным повышением уровня клеток с повреждениями ДНК и/или цитогенетических нарушений, включая частоту клеток с МЯ, что связывают как с эффектами некоторых мутагенов, так и с активацией окислительного стресса [16, 18].

Заключение

Показано, что у больных лихорадочной формой КЭ в острый и реконвалесцентный периоды заболевания наблюдается существенное увеличение частоты встречаемости иммунокомпетентных (лимфоцитов) и неиммунокомпетентных (буккальных) клеток с МЯ, по сравнению со здоровыми людьми, что зависит от носительства в генотипе больного активных или неактивных (делеционных) вариантов генов глутатион-S-трансфераз *GSTM1(0/0)* и *GSTT1(0/0)*. Установлено, что наиболее выраженное и длительное (до 6 месяцев) сохранение повышенной частоты клеток с цитогенетическими нарушениями было обнаружено в цитокинез-блокированных Т-лимфоцитах периферической крови больных КЭ, являющихся носителями генотипа с неактивными аллелями двух генов глутатион-S-трансферазы *GSTM1(0/0)* и *GSTT1(0/0)*.

Список литературы/References

- Захарычева Т.А., Ковальский Ю.Г., Лебедько О.А., Мжельская Т.В. Оксидативный стресс у больных клещевым энцефалитом на Дальнем Востоке Российской Федерации // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2012. Т. 20, № 8. С. 41–45. [Zaharicheva T.A., Koval'skii Yu. G., Lebed'ko O.A., Mzhel'skaya T.V. Oxidative stress in patients with tick-borne encephalitis in the Far East of The Russian Federation. *Dal'nevostochnyy zhurnal infektsionnoy patologii = Far Eastern Journal of Infectious Pathology*, 2012, vol. 20, no. 8, pp. 41–45. (In Russ.)]
- Ильинских И.Н., Ильинских Е.Н., Новицкий В.В., Ильинских Н.Н., Ткаченко С.Б. Инфекционная кариопатология. Томск: Томский государственный университет, 2005. 168 с. [Il'inskih I.N., Novickij V.V., Il'inskih E.N., Il'inskih N.N., Tkachenko S.B. Infectious karyopathology. *Tomsk: Tomskij gosudarstvennyj universitet*, 2005. 168 p. (In Russ.)]
- Ильинских Н.Н., Васильев С.А., Кравцов В.Ю. Микроядерный тест в скрининге и мониторинге мутагенов. Saarbrücken (Deutschland): LAP LAMBERT Academic Publishen. GmbH&Co.KG., 2011. 216 с. [Il'inskih N.N., Vasil'ev S.A., Kravcov V.Ju. Micronuclear test in screening and monitoring of mutagens. *Saarbrücken (Deutschland). LAP LAMBERT Academic Publishen. GmbH&Co.KG.*, 2011, 216 p. (In Russ.)]
- Леготкин А.Н., Лопатина А.Б. Исследование генов GSTP1, GSTT1, GSTM1 // Успехи современной науки. 2016. Т. 2, № 9. С. 23–25. [Legotkin, A.N., Lopatina A.B. Study of genes of GSTP1, GSTT1, GSTM1. *Uspehi sovremennoj nauki = Successes of Contemporary Science*, 2016, vol. 2, no. 9, pp. 23–25. (In Russ.)]
- Степанова Н.А., Галимзянов Х.М., Кантемирова Б.И. Синдром интоксикации у больных туберкулезом легких в зависимости от полиморфизма генов системы глутатионтрансфераз // Журнал инфектологии. 2017. Т. 9, № 2. С. 13–16. [Stepanova N.A., Kantemirova B.I., Galimzyanov Kh.M. Intoxication syndrome in patients with pulmonary tuberculosis in relation to the system glutathione transferase gene polymorphism. *Zhurnal infektologii = Journal Infectology*, 2017, vol. 9, no. 2, pp. 13–16. doi: 10.22625/2072-6732-2017-9-2-13-16 (In Russ.)]
- Филиппова И.Н., Хрунин А.В., Лимборская С.А. Анализ делеции гена GSTM1 в контексте гаплотипического разнообразия геномного кластера GSTM в трех русских популяциях // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2014. № 2. С. 8–12. [Filippova I.N., Khrunin A.V., Limborska S.A. Analysis of GSTM1 gene deletion in the context of the haplotype diversity of the GSTM genomic cluster in three Russian populations. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 2014, no. 2, pp. 8–12. (In Russ.)]
- Хасанова Г.М., Тутельян А.В., Валишин Д.А., Хасанова А.Н. Прогностическая значимость полиморфизма генов ферментов детоксикации у больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом // Журнал инфектологии. 2016. Т. 8, № 1. С. 73–78. [Hasanova G.M., Valishin D.A., Tutel'jan A.V., Hasanova A.N. Forecasting model of gene enzyme polymorphism detoxification in patients suffered from HFRS. *Zhurnal infektologii = Journal Infectology*, 2016, vol. 8, no. 1, pp. 73–78. (In Russ.)]
- Bigatti M.P., Santovito A. Glutathione S-transferase T1 (GSTT1) and M1 (GSTM1) polymorphisms in a sample of the population in Northern Italy. *Russ. J. Genetics*, 2007, vol. 43, iss. 6, pp. 685–688.
- Board P.G., Menon D. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Acta Biochim. Biophys.*, 2013, vol. 1830, no. 5, pp. 3267–3288. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.11.019

10. Bolognesi C., Fenech M. Micronucleus assay in human cells: lymphocytes and buccal cells. *Methods Mol. Biol.*, 2013, vol. 1044, pp. 191–207. doi: 10.1007/978-1-62703-529-3_10
11. Fenech M., Kirsch-Volders M., Natarajan A.T., Surrallés J., Crott J.W., Parry J., Norppa H., Eastmond D.A., Tucker J.D., Thomas P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 2011, vol. 26, pp. 125–132. doi: 10.1093/mutage/geq052
12. Fernandes R.C., Hasan M., Gupta H., Geetha K., Rai P.S., Hande M.H., D'Souza S.C., Adhikari P., Brand A., Satyamoorthy K. Host genetic variations in glutathione-S-transferases, superoxide dismutases and catalase genes influence susceptibility to malaria infection in an Indian population. *Mol. Genet. Genomics*, 2015, vol. 290, no. 3, pp. 1155–1168. doi: 10.1007/s00438-014-0984-4
13. Hung R.J., Boffetta P., Brockmüller J., Butkiewicz D., Cascorbi I., Clapper M.L., Garte S., Haugen A., Hirvonen A., Anttila S., Kalina I., Le Marchand L., London S.J., Rannug A., Romkes M., Salagovic J., Schoket B., Gaspari L., Taioli E. CYP1A1 and GSTM1 genetic polymorphisms and lung cancer risk in Caucasian non-smokers: a pooled analysis. *Carcinogenesis*, 2003, vol. 24, no. 5, pp. 875–882. doi: 10.1093/carcin/bgg026
14. Il'inskikh N.N., Il'inskikh I.N. Effect of virus of tick-borne encephalitis virus on the chromosome apparatus of human cells. *Tsitol. Genet.*, 1976, vol. 10, no. 4, pp. 331–333.
15. Parsons M., Campa A., Lai S., Li Y., Martinez J.D., Murillo J., Greer P., Martinez S.S., Baum M.K. Effect of GSTM1-polymorphism on disease progression and oxidative stress in HIV infection: modulation by HIV/HCV co-infection and alcohol consumption. *J. AIDS Clin. Res.*, 2013, vol. 4, no. 9, pp. 248–252. doi: 10.4172/2155-6113.1000237
16. Priya K., Yadav A., Kumar N., Gulati S., Aggarwal N., Gupta R. Glutathione S-transferase gene polymorphisms: modulator of genetic damage in gasoline pump workers. *Int. J. Toxicol.*, 2015, vol. 34, no. 6, pp. 500–504. doi: 10.1177/1091581815603935
17. Saha S.K., Lee S.B., Won J., Choi H.Y., Kim K., Yang G.M., Dayem A.A., Cho S.G. Correlation between oxidative stress, nutrition, and cancer initiation. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, vol. 18, no. 7: e1544. doi: 10.3390/ijms18071544
18. Skjelbred C.F., Svendsen M., Haugan V., Eek A.K., Clausen K.O., Kure E.H., Tuimala J.T., Svendsen M.V., Norppa H., Hansteen I.L. Influence of GSTM1, GSTT1, GSTP1, NAT1, NAT2, EPHX1, MTR and MTHFR polymorphism on chromosomal aberration frequencies in human lymphocytes. *Carcinogenesis*, 2011, vol. 32, no. 3, pp. 399–405. doi: 10.1093/carcin/bgq246
19. Zeng Y., Bai J., Deng L.C., Xie Y.P., Zhao F., Huang Y. Association of the glutathione S-transferase T1 null genotype with risk of gastric cancer: a meta-analysis in asian populations. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2016, vol. 17, no. 3, pp. 1141–1148.

Авторы:

Ильинских Н.Н., д.б.н., профессор, профессор кафедры биологии и генетики ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, Россия; профессор кафедры экологии, природопользования и экологической инженерии ФГАОУ ВО Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск, Россия;

Ильинских Е.Н., д.м.н., доцент, профессор кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, Россия; профессор кафедры экологии, природопользования и экологической инженерии ФГАОУ ВО Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск, Россия;

Замятина Е.В., ассистент кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, Россия;

Ли С.В., студент 5 курса педиатрического факультета ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, Россия.

Authors:

Ilyinskikh N.N., PhD, MD (Biology), Professor, Professor of Department of Biology and Genetics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation; Professor of Department of Ecology, Nature Management and Environmental Engineering, National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation;

Ilyinskikh E.N., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor of Department of Infectious Diseases and Epidemiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation; Professor of Department of Ecology, Nature Management and Environmental Engineering, National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation;

Zamyatina E.V., Assistant of Department of Infectious Diseases and Epidemiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation;

Lee S.V., 5th year Student of the Pediatric Faculty, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

ГУМОРАЛЬНЫЙ И КЛЕТОЧНЫЙ ИММУНИТЕТ К АНТИГЕНАМ ВИРУСОВ КОРИ И КРАСНУХИ У ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

М.А. Смердова¹, А.П. Топтыгина^{1,3}, Ю.Ю. Андреев¹, С.В. Сенникова¹,
А.Ю. Зеткин², Т.Г. Клыкова², С.И. Беляков⁴

¹ ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия

² ФГКУ Главный центр государственного санитарно-эпидемиологического надзора (специального назначения) МО РФ, Москва, Россия

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

⁴ ФКУ «Войсковая часть 83466», Москва, Россия

Резюме. Проблема элиминации инфекций, вызванных вирусами кори и краснухи, до сих пор остается нерешенной, несмотря на существующие эффективные методы специфической профилактики и приверженность ВОЗ проведению политики массовой вакцинации. На фоне улучшающейся эпидемиологической обстановки особый интерес представляет анализ новых проблем, таких как заболеваемость корью взрослых, особенно вакцинированных в детском возрасте. Целью исследования было проанализировать наличие специфических IgG-антител против вирусов кори и краснухи в сыворотке крови молодых здоровых людей и выявить в группе серонегативных наличие специфического клеточного иммунного ответа на вирусы кори и краснухи. Были обследованы 100 здоровых взрослых в возрасте 18–30 лет. Уровень специфических IgG определяли методом ИФА (тест-системы фирмы «Вектор-Бест»). Специфический клеточный иммунитет оценивали по экспрессии CD107a на CD8^{hi}-лимфоцитах в ответ на антигены вирусов кори и краснухи. Обнаружено, что средний уровень антител против вируса краснухи составляет 175,5 МЕ/мл, при этом 49% обследованных переболели краснухой, 46% были привиты и 5% не имели специфических антител. Средний уровень антител против вируса кори оказался ниже защитного уровня, при этом 1% обследованных перенес корь, 31% имел поствакцинальный иммунитет, 55% были серонегативные, а 13% имели сомнительный уровень специфических антител («серая зона»). Таким образом, 68% обследованных оказались незащищенными от вируса кори по уровню специфических антител. Известно, что 40 из этих 68 человек были вакцинированы против кори в детстве. Эти 68 здоровых взрослых дополнительно обследованы на наличие специфического клеточного иммунитета к вирусу кори и краснухи. У 57,37% выявлен специфический клеточный иммунитет к вирусу кори и у 59,01% к вирусу краснухи. Дальнейший анализ позволил выделить 4 подгруппы: 1) с высоким уровнем антител и специфических Т-клеток; 2) не имеющие ни антител, ни специфических Т-клеток — 20% от исходной группы; 3) сочетание высокого уровня антител и низкого уровня специфических Т-клеток и 4) сочетание низкого уровня антител и высокого уровня специфических Т-клеток. Можно предположить, что клеточный и гуморальный иммунитет сохраняются независимо друг от друга и функционируют длительное время после вакцинации. Сохранение специфического Т-клеточного иммунитета обеспечивает, по-видимому, защиту против инфекции, это объясняет, почему не все серонегативные заболевают корью.

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

Адрес для переписки:

Топтыгина Анна Павловна
125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10,
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского.
Тел.: 8 (495) 452-18-01 (служебн.); 8 916 389-66-04 (моб.).
Факс: 8 (495) 452-18-30.
E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

Contacts:

Anna P. Toptygina
125212, Russian Federation, Moscow, Admiral Makarov str., 10,
G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology
and Microbiology.
Phone: +7 (495) 452-18-01 (office); +7 (916) 389-66-04 (mobile).
Fax: +7 (495) 452-18-30.
E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

Библиографическое описание:

Смердова М.А., Топтыгина А.П., Андреев Ю.Ю., Сенникова С.В.,
Зеткин А.Ю., Клыкова Т.Г., Беляков С.И. Гуморальный и клеточный
иммунитет к антигенам вирусов кори и краснухи у здоровых людей //
Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 3–4. С. 607–611. doi: 10.15789/2220-
7619-2019-3-4-607-611

Citation:

Smerdova M.A., Toptygina A.P., Andreev Yu.Yu., Sennikova S.V.,
Zetkin A.Yu., Klykova T.G., Belyakov S.I. Humoral and cellular immunity to measles and
rubella virus antigens in healthy subjects // Russian Journal of Infection
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 3–4, pp. 607–611.
doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-607-611

© Смердова М.А. и соавт., 2019

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2019-3-4-607-611>

HUMORAL AND CELLULAR IMMUNITY TO MEASLES AND RUBELLA VIRUS ANTIGENS IN HEALTHY SUBJECTS

Smerdova M.A.^a, Toptygina A.P.^{a,c}, Andreev Yu.Yu.^a, Sennikova S.V.^a, Zetkin A.Yu.^b, Klykova T.G.^b, Belyakov S.I.^d

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

^b Main Center of State Sanitary and Epidemiological Supervision (of Special Purpose), Ministry of Defense of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

^c Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

^d Military Unit 83466, Moscow, Russian Federation

Abstract. An issue of eradicating measles and rubella virus-induced infections currently remains unresolved, despite existing effective methods for specific prophylaxis and WHO's commitment to a mass vaccination policy. While improving epidemic situation, analysis of new challenges, such as measles incidence in adults, especially in adults vaccinated in childhood, is of particular interest. The aim of the study was to analyze serum measles and rubella virus-specific IgG antibodies in young healthy people and estimate antigen-specific cellular immune response in seronegative subjects. There were examined 100 healthy adults aged 18–30 years old. Level of serum specific IgG was measured by ELISA (Vector-Best, Russia). Antigen-specific cellular immune response was assessed by magnitude of surface CD107a expression on CD8hi T cells challenged by measles and rubella virus-derived antigens. It was found that average level of antibodies against rubella virus comprised 175.5 IU/ml, 49% of which recovered after rubella, 46% were vaccinated, whereas 5% subjects contained no virus-specific antibodies. In addition, mean level of anti-measles virus antibodies was below protective magnitude, among which 1% subjects recovered after measles, 31% displayed post-vaccination immunity, 55% subjects were seronegative, and 13% had equivocal levels of specific antibodies. Thus, 68% subjects were unprotected against measles virus based on the level of serum virus-specific antibodies. Moreover, 40 out of 68 subjects were vaccinated against measles in childhood. Additional screening adult subjects for intensity of measles and rubella virus-specific cellular immunity demonstrated that 57.37% of them contained peripheral blood CD8 T cells against measles virus and 59.01% — against rubella virus. Further analysis allowed to identify 4 subgroups displaying: 1) high level of virus-specific antibodies and T cells; 2) neither antibodies nor specific T-cells reaching as low as 20% of baseline group; 3) high antibody level combined with low amount of specific T cells; and 4) low antibody level combined with high level of specific T cells. thus, it may be assumed that cellular and humoral immune arms are maintained independently and being active for a long term after vaccination. Preserving a specific T-cell immunity seems to provide protection against infection, thereby accounting for the lack of measles manifestation in all seronegative subjects.

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

Введение

Проводимая под эгидой ВОЗ политика активной массовой вакцинации населения против кори и краснухи дала неоспоримые результаты. Резко снизилась заболеваемость корью и смертность от этой инфекции [9, 11]. На фоне улучшающейся эпидобстановки на первый план стали выходить другие проблемы, например заболеваемость корью взрослых, и даже привитых в детстве от этой инфекции лиц [3, 7]. Проведенное нами ранее исследование выявило существенное снижение процента лиц, имеющих защитные IgG-антитела против вирусов кори у молодых взрослых в возрасте 18–30 лет, составившее до 45% [6]. Важно, что эти люди должны были быть привиты, так как к моменту их рождения вакцина от кори входила в график прививок и активно применялась. Ранее было показано, что после вакцинации против кори и краснухи формируется не только антительный, но и клеточный иммунный ответ, способный годами сохраняться в иммунном организме [5]. В связи с вышесказанным, целью данного исследования было проанализировать наличие специфических IgG-антител против вирусов кори и краснухи в сыворотке крови 100 здоровых

индивидуумов в возрасте 18–30 лет и выявить в группе серонегативных наличие специфического клеточного иммунного ответа на вирусы кори и краснухи.

Материалы и методы

Были обследованы 100 здоровых индивидуумов в возрасте от 18 до 30 лет. Работа была одобрена локальным этическим комитетом ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского, обследованные подписывали информированное согласие на участие в исследованиях. Взятие крови осуществляли из локтевой вены в количестве 4 мл в пробирки с гелем и с гепарином натрия. Сыворотку крови, полученную центрифугированием, разливали в пробирки типа Эппендорф, замораживали и хранили до использования при -70°C . Специфические IgG-антитела в сыворотке крови определяли методом ИФА с помощью тест-систем фирмы «Вектор-Бест» (Россия) «ВектоКорь IgG», «ВектоКраснуха IgG». Оценку специфической активности сывороток проводили согласно инструкции, прилагаемой к наборам. Защитным уровнем IgG для кори считали показатель 0,2 МЕ/мл [8], для краснухи — 25 МЕ/мл. Разделение полученных результатов

на поствакцинальный и постинфекционный иммунитет осуществляли по уровню содержания специфических IgG. Так, позитивные значения уровня специфических противокоревых IgG менее 1 МЕ/мл расценивались как поствакцинальные антитела, а более высокие значения IgG говорили о перенесенной инфекции. Для краснухи таким пороговым значением считали 200 МЕ/мл [6].

Фракцию мононуклеаров выделяли методом градиентного центрифугирования. В 3 стерильные пробирки типа Эппендорф (объем 1,5 мл) вносили: по 50 мкл раствора моненсина (в конечной концентрации 10 мкМ), суспензии мононуклеаров в среде RPMI-1640 (10% телячьей эмбриональной сыворотка, 2 мМ L-глутамин, гентамицин) 10^6 клеток на пробирку, моноклональные антитела к CD107a-PE-Cy5 (конечное разведение 1:100) и 10 мкл антигенов вирусов кори или краснухи. В контрольную пробирку вместо антигенов вносили 10 мкл среды. Пробирки инкубировали 15 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂ и 100% влажности. По окончании инкубации клетки отмывали в забуференном фосфатами физиологическом растворе с добавлением 0,02% азида натрия и 0,02% Na₂-ЭДТА и окрашивали FITC-мечеными антителами к CD8 20 мин в темноте, затем снова отмывали. Клетки анализировали на проточном цитометре FACSCantoII (технологии и программное обеспечение Becton Dickinson, США). В выделенном гейте CD8^{hi} лимфоцитов детектировали экспрессию CD107a. Такие клетки соответствуют дегранулировавшим цитотоксическим Т-лимфоцитам, распознавшим коревой или краснушный антиген соответственно. Уровень спонтанной дегрануляции не превышал 1%.

Полученные результаты были подвергнуты статистической обработке с вычислением медианы, первой и третьей квартили.

Результаты и обсуждение

Обнаружено, что средний уровень противокраснушных антител превышает защитный уровень и составляет 175,5 (82,99–466,1) МЕ/мл [Ме (LQ-UQ)]. Средний уровень антител против вируса кори ниже защитного уровня и составляет 0,09 (0,02–0,26) МЕ/мл [Ме (LQ-UQ)].

Структура защищенности от кори и краснухи по уровню специфических антител представлена на рисунке 1. Подавляющее большинство обследованных имело защитные уровни антител против вируса краснухи. Такой уровень защиты был достигнут за счет 49% переболевших краснухой и 46% привитых от этой инфекции. Только 5% не имели защитных антител к краснухе. Совсем иначе выглядел спектр антител против вируса кори. Среди обследованных лиц 1% имел высокий уровень специфических антител, приобретенный в результате перенесенного заболевания,

31% имел защитные уровни антител в результате прививки. Серонегативными оказались 55% обследованных и еще 13% имели следы специфических антител, но ниже защитного уровня. Таким образом, незащищенными от кори по уровню специфических IgG-антител оказались 68% обследованных лиц. Следует отметить, что в предыдущих исследованиях в возрастной группе 18–30 лет снижение специфического гуморального иммунитета к вирусу кори было выявлено у 45% обследованных [6]. Эти различия могут быть связаны с тем, что в предыдущем исследовании группу обследованных составили жители Москвы. Москва является неблагоприятной территорией по кори, вспышки случаются практически каждый год, поэтому у восприимчивых к вирусу кори людей в Москве есть больше шансов встретить дикий штамм вируса кори и заболеть. Действительно, в обсуждаемой возрастной группе 20% людей имели противокоревые антитела, приобретенные в результате перенесенной инфекции. В настоящем исследовании в группу здоровых людей в возрасте 18–30 лет были отнесены люди, проживающие на всей территории нашей страны от Калининграда до Красноярска и от Архангельска до Северной Осетии. На многих территориях вспышек кори не регистрировалось уже несколько лет, следовательно, незащищенные восприимчивые к кори люди могут не болеть, просто не встречаясь с вирусом кори. И действительно, в настоящем исследовании только 1% обследованных приобрел иммунитет в результате заболевания корью.

Все 68% выявленных серонегативных индивидов вошли в группу, подвергшуюся более детальному исследованию. У них был дополнительно собран прививочный анамнез. Выяснилось, что у 28 человек нет сведений о прививках, тогда

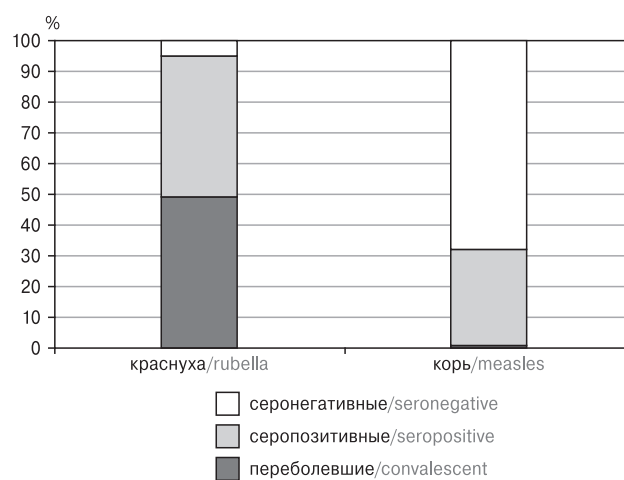


Рисунок 1. Структура гуморального иммунитета (%) против вирусов кори и краснухи у здоровых людей 18–30 лет

Figure 1. The structure (%) of humoral anti-measles and anti-rubella immunity in healthy people of 18–30 years old

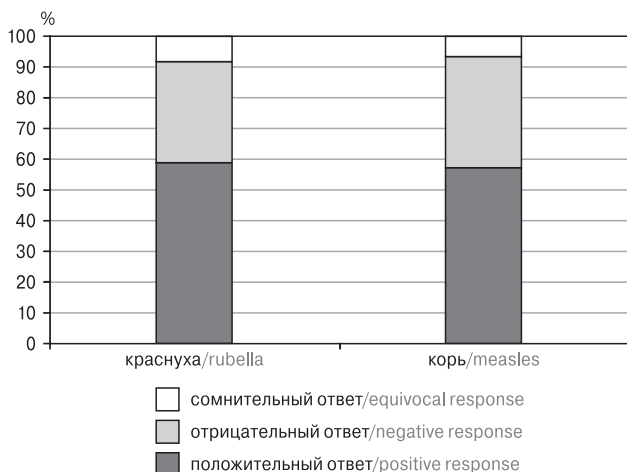


Рисунок 2. Клеточный иммунитет против вирусов кори и краснухи у здоровых людей 18–30 лет (% CD8^{hi}CD107a⁺ лимфоцитов)

Figure 2. Cellular immunity against measles and rubella viruses in healthy people 18–30 years old (% CD8^{hi}CD107a⁺ lymphocytes)

как у 40 человек такие сведения имелись. Из них у 4 были сведения только о первой прививке в возрасте 1 года и у 3 — только сведения, что привиты по возрасту, без указания о конкретной прививке против кори.

У всех 68 человек, не имевших защитных уровней антител к вирусу кори, был исследован специфический клеточный иммунитет против антигенов вирусов кори и краснухи. Полученные результаты представлены на рисунке 2. Специфический клеточный ответ на антигены вирусов краснухи был выявлен у 59,01% обследованных, у 32,79% специфический клеточный иммунитет на краснуху отсутствовал, а у 8,2% был расценен как сомнительный. Важно, что люди, не имевшие защитных антител к вирусу краснухи, имели специфический клеточный ответ на антигены краснухи, что свидетельствует об их защищенности. В то же время 20 человек не имели специфического клеточного ответа на антигены краснухи, несмотря на то, что у них были выявлены защитные уровни противокраснушных антител. Из них 7 человек имели очень высокие уровни противокраснушных антител (от 300 и до 1000 МЕ/мл), полученные в результате перенесенной инфекции. Специфический клеточный ответ на антигены вирусов кори был обнаружен у 57,37% обследованных лиц, у 36,07% специфического клеточного иммунного ответа на антигены кори выявлено не было, а у 6,56% ответ был расценен как сомнительный. При этом следует помнить, что все обследованные на клеточный иммунитет люди не имели защитных антител к вирусу кори. Интересно, что в подгруппе с неизвестным прививочным анамнезом 66,67% людей получили лабораторное подтверждение об имевших место контактах с вирусом кори (то есть они когда-то в детстве

были привиты от кори). В то же время в группе имевших сведения о прививках только 58,33% получили лабораторное подтверждение, что были ранее привиты от кори. Суммарно 5 человек из группы с неизвестным прививочным анамнезом и 15 человек из группы с имеющимися сведениями о прививках не имели ни гуморального, ни клеточного иммунитета против кори, то есть 20% от исходной группы в 100 человек были абсолютно не защищены против кори. Важно понять, были ли эти люди реально и качественно привиты и утратили иммунную защиту в процессе жизни, или сведения о прививках не соответствовали действительности. В любом случае, эти люди являются потенциально подверженными заболеванию корью.

В результате проведенных исследований было обнаружено, что клеточный и гуморальный иммунный ответ против вирусов кори и краснухи сохраняется многие годы после прививки, по-видимому, независимо друг от друга. Так, в обследованной группе были выявлены люди, имевшие высокий уровень антител и специфических цитотоксических Т-клеток. Также были обнаружены индивидуумы, не имевшие ни антител, ни специфического клеточного ответа на исследуемые вирусы. Более того, были выявлены сочетания высокого уровня антител с отсутствием специфического клеточного ответа, и наоборот — хороший специфический клеточный ответ при отсутствии специфических антител. К аналогичным выводам пришла группа авторов, исследовавшая гуморальный иммунитет против кори у подростков, привитых в детстве против кори [10]. Хотя известно, что формирование специфических антител, это Т-зависимый тип иммунного ответа, сам процесс выживания плазматических клеток и цитотоксических клеток памяти осуществляется за счет независимых механизмов и опосредуется различными группами клеток и гомеостатических молекул [1, 2]. Можно думать, что сохранение специфического Т-клеточного иммунного ответа на антигены вирусов кори и краснухи у серонегативных ранее привитых лиц обеспечивает им защиту против инфекции. Это объясняет, почему не все серонегативные лица заболевают корью. Однако точное подтверждение этой гипотезы можно получить только в условиях эпидочага, где можно было бы точно установить, какой уровень клеточной защиты позволяет избежать заболевания корью. Было бы также интересно исследовать, как реагируют на вакцинацию против кори те 20 человек, у которых не было обнаружено ни клеточного, ни гуморального специфического иммунитета на вирусы кори. Ранее нами было показано, что по соотношению различных параметров гуморального иммунного ответа можно разделить первичный и вторичный иммунный ответ [3, 4], что позволит понять, были ли эти люди привиты в детстве против кори или нет.

Список литературы/References

1. Топтыгина А.П. Т-клетки памяти // Иммунология. 2008. Т. 29, № 5. С. 311–317. [Toptygina A.P. T-memory cells. *Immunologiya = Immunology*, 2008, vol. 29, no. 5, pp. 311–317. (In Russ.)]
2. Топтыгина А.П. Лимфоидный фолликул — территория иммунного ответа // Иммунология. 2012. Т. 33, № 3. С. 162–169. [Toptygina A.P. Lymphoid follicle — area of the immune response. *Immunologiya = Immunology*, 2012, vol. 33, no. 3, pp. 162–169. (In Russ.)]
3. Топтыгина А.П., Мамаева Т.А., Алешкин В.А. Особенности специфического гуморального иммунного ответа против вируса кори // Инфекция и иммунитет. 2013. Т. 3, № 3. С. 243–250. [Toptygina A.P., Mamaeva T.A., Alioshkin V.A. Peculiarities of specific humoral measles immune response. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2013, vol. 3, no. 3, pp. 243–250. doi: 10.15789/2220-7619-2013-3-243-250 (In Russ.)]
4. Топтыгина А.П., Пухальский А.Л., Мамаева Т.А., Алешкин В.А., Спектр субклассов противокоревых иммуноглобулинов G у лиц, перенесших корь // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2004. Т. 137, № 3. С. 293–295. [Toptygina A.P., Mamaeva T.A., Alioshkin V.A., Pukhalskii A.L. Spectrum of anti-measles immunoglobulin G subclasses in convalescents after measles. *Bulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2004, vol. 137, no. 3, pp. 259–261. doi: 10.1023/B:BEEM.0000031564.27747.b4 (In Russ.)]
5. Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Алешкин В.А. Формирование и поддержание специфического клеточного ответа на вакцинацию «Приорикс» // Иммунология. 2013. Т. 34, № 5. С. 257–261. [Toptygina A.P., Semikina E.L., Alioshkin V.A. The shaping and the maintenance of T-cell specific immune response to vaccination Priorix. *Immunologiya = Immunology*, 2013, vol. 34, no. 5, pp. 257–261. (In Russ.)]
6. Топтыгина А.П., Смердова М.А., Наумова М.А., Владимировна Н.П., Мамаева Т.А. Влияние особенностей популяционного иммунитета на структуру заболеваемости корью и краснухой // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 3. С. 341–348. [Toptygina A.P., Smerdova M.A., Naumova M.A., Vladimirova N.P., Mamaeva T.A. Influence of population immunity peculiarities on the structure of measles and rubella prevalence. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2018, vol. 8, no. 3, pp. 341–348. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-341-348 (In Russ.)]
7. Filia A., Bella A., Del Manso M., Baggieri M., Magurano F., Rota M. C. Ongoing outbreak with well over 4,000 measles cases in Italy from January to end August 2017 — what is making elimination so difficult? *Euro Surveill.*, 2017, vol. 22 (37): 30614. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.37.30614
8. Tischer A., Gassner M., Richard J.-L., Suter-Riniker F., Mankertz A., Heininger U. Vaccinated students with negative enzyme immunoassay results show positive measles virus-specific antibody levels by immunofluorescence and plaque neutralization test. *J. Clin. Virol.*, 2007, vol. 38, pp. 204–209. doi: 10.1016/j.jcv.2006.12.017
9. Van den Ent M., Brown D.W., Hoekstra E.J., Christie A., Cochi S.L. Measles mortality reduction contributes significantly to mortality among children less than five years of age, 1990–2008. *J. Infect. Dis.*, 2011, vol. 203, pp. S18–S23. doi: 10.1093/infdis/jir081
10. Vries R.D., Swart R.L. Evaluating measles vaccines: can we assess cellular immunity? *Expert Rev. Vaccines*, 2012, vol. 11 (7), pp. 779–782. doi: 10.1586/erv.12.45
11. World Health Organization Regional Office for Europe (WHO/Europe). Fifth Meeting of the European Regional Verification Commission for Measles and Rubella Elimination (RVC) 24–26 October 2016. *Copenhagen, Denmark. Copenhagen: WHO/Europe* [Accessed 31 Aug 2017]. URL: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0005/330917/5th-RVC-meeting-report.pdf?ua=1

Авторы:

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

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

Андреев Ю.Ю., аспирант ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Сенникова С.В., аспирант ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Зеткин А.Ю., начальник организационно-планового отдела, зам. начальника ФГКУ Главный центр государственного санитарно-эпидемиологического надзора (специального назначения) МО РФ, Москва, Россия;

Клыкова Т.Г., врач-эпидемиолог ФГКУ Главный центр государственного санитарно-эпидемиологического надзора (специального назначения) МО РФ, Москва, Россия;

Беляков С.И., фельдшер первого автомобильного парка ФКУ «Войсковая часть 83466», Москва, Россия.

Authors:

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

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

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

Sennikova S.V., PhD Student, Laboratory of Cytokines, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Zetkin A.Yu., Head of Organizational Planning Department, Deputy Head of Main Center of State Sanitary and Epidemiological Supervision (of Special Purpose), Ministry of Defense of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

Klykova T.G., Epidemiologist, Main Center of State Sanitary and Epidemiological Supervision (of special purpose), Ministry of Defense of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

Belyakov S.I., Paramedic of the First Automobile Park, Military Unit 83466, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 23.12.2018
Принята к печати 13.03.2019

Received 23.12.2018
Accepted 13.03.2019

ДИНАМИКА СЫВОРОТОЧНОГО УРОВНЯ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОК С ОСТРЫМИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ОРГАНОВ МАЛОГО ТАЗА НА РАННИХ СРОКАХ КОНСЕРВАТИВНОГО ЛЕЧЕНИЯ

Н.А. Бурова, П.А. Солтыс, Н.А. Жаркин, М.С. Селихова, Н.И. Свиридова,
Э.Б. Белан

ФГБОУ ВО Волгоградский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Волгоград, Россия

Резюме. Изучена динамика интерлейкинов-1, -2 и -6 (IL-1, IL-2, IL-6), фактора некроза опухоли альфа (TNF α) у пациенток репродуктивного возраста с острыми воспалительными заболеваниями органов малого таза (ВЗОМТ) при стандартном и усовершенствованном (с применением вагинальной низкочастотной лазеропунктуры в постоянном непрерывном магнитном поле) вариантах консервативного лечения. Исследование проводилось при поступлении в стационар до начала терапии, на фоне общепринятых и усовершенствованного методов лечения. Полученные данные о сывороточном уровне цитокинов сопоставлены с аналогичными показателями 20 здоровых женщин-добровольцев репродуктивного возраста, обратившихся за подбором метода контрацепции. Проведенное исследование выявило, что цитокиновый профиль обследованных в острый период воспалительных процессов в органах малого таза характеризуется высоким уровнем провоспалительных цитокинов. В динамике общепринятого лечения наблюдавшиеся снижения уровней в сыворотке крови IL-1, IL-2, IL-6 и TNF α были незначительными, и показатели не приближались к показателям здоровых женщин. Это может отражать продолжение воспалительного процесса, несмотря на положительную клиническую динамику. В свою очередь отсутствие разрешения воспаления приводит к стойкому нарушению фертильности женского организма и необходимости выполнения последующих комплексных реабилитационных мероприятий. На фоне применения интравагинального низкочастотного лазерного излучения в постоянном магнитном поле уровни сывороточного содержания TNF α < 100 пг/мл отмечалось в 59,7% случаев, значения IL-6 < 20 пг/мл (преобладающие у здоровых женщин) определялись в 54,2% случаев. Сывороточные уровни IL-2 снизились в 3,5 раза от исходных значений, а сывороточная концентрация IL-1 β > 100 пг/мл имела место лишь у 23,6% обследованных. Выявленная динамика маркеров воспалительного процесса с достоверно быстрым снижением уровня провоспалительных цитокинов в сыворотке крови в группе пациенток с преформированными факторами воздействия может отражать более быстрое разрешение воспалительного процесса,

Адрес для переписки:

Бурова Наталья Александровна
400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1,
ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский
университет» МЗ РФ.
Тел.: 8 (8442) 36-38-14 (служебн.); 8 903 371-54-34 (моб.).
E-mail: natalia-burova@yandex.ru

Contacts:

Natalia A. Burova
400131, Russian Federation, Volgograd, Pavshikh Bortsov sq., 1,
Volgograd State Medical University.
Phone: +7 (8442) 36-38-14 (office); +7 903 371-54-34 (mobile).
E-mail: natalia-burova@yandex.ru

Библиографическое описание:

Бурова Н.А., Солтыс П.А., Жаркин Н.А., Селихова М.С., Свиридова Н.И.,
Белан Э.Б. Динамика сывороточного уровня провоспалительных
цитокинов у пациенток с острыми воспалительными заболеваниями
органов малого таза на ранних сроках консервативного
лечения // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 3–4. С. 612–616.
doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-612-616

Citation:

Burova N.A., Soltys P.A., Zharkin N.A., Selikhova M.S., Sviridova N.I.,
Belan E.B. Dynamics of proinflammatory cytokine serum levels in patients
with acute inflammatory diseases of pelvic organs in the early stages
of conservative treatment // Russian Journal of Infection and Immunity =
Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 3–4, pp. 612–616. doi: 10.15789/2220-
7619-2019-3-4-612-616

© Бурова Н.А. и соавт., 2019

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2019-3-4-612-616>

что, в свою очередь, может способствовать снижению вероятности образования соединительнотканых элементов. Полученные результаты исследования позволяют шире использовать в лечении пациенток с острыми ВЗОМТ сочетанные физические факторы воздействия.

Ключевые слова: цитокины, воспалительные заболевания органов малого таза, иммунный ответ, гуморальный иммунитет, лазеро-магнитопунктура, репродуктивная функция.

DYNAMICS OF PROINFLAMMATORY CYTOKINE SERUM LEVELS IN PATIENTS WITH ACUTE INFLAMMATORY DISEASES OF PELVIC ORGANS IN THE EARLY STAGES OF CONSERVATIVE TREATMENT

Burova N.A., Soltys P.A., Zharkin N.A., Selikhova M.S., Sviridova N.I., Belan E.B.

Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation

Abstract. Dynamics of serum proinflammatory cytokines such as interleukins (IL)-1, -2 and -6, tumor necrosis factor alpha (TNF α) was examined in patients of reproductive age suffering from acute inflammatory diseases of the pelvic organs. Our study was carried out with female patients at hospital admission prior to therapy applied with conventional methods of treatment and improved treatment by using vaginal low-frequency laser in a constant continuous magnetic field. The data obtained were compared with serum cytokine level from 20 healthy female volunteers of reproductive age consulted on better contraception methods. It was found that cytokine profile of in patients with acute inflammatory processes in pelvic organs was characterized by a high level of proinflammatory cytokines. It was shown that patients receiving conventional treatment contained decreased level of serum IL-1, IL-2, IL-6 and TNF α displaying slight dynamics, which did not reach it in control group. This may contribute to ongoing inflammatory process, despite the positive clinical dynamics. In turn, imbalance of immune responses leads to a persistently impaired fertility in women and need to perform subsequent comprehensive rehabilitation measures. Moreover, patients applied with intravaginal low-frequency laser radiation in a constant magnetic field were found to contain serum TNF α < 100 pg/ml observed in 59.7% of cases, IL-6 level was lower than 20 pg/ml (prevalent in control group) found in 54.2% of cases. Serum IL-2 level was decreased by 3.5-fold compared to baseline, whereas for IL-1 β it was higher than 100 pg/ml in as few as 23.6% patients. Such temporal pattern of inflammatory markers with rapid significant decrease of serum proinflammatory cytokines in patients with preformed pathogenic factors can reduce probability of connective tissue formation and activate their own repair as well as regenerative events. The results obtained allow to wider use combined physical interventional factors for therapy of patients with acute inflammatory diseases of the pelvic organs.

Key words: cytokines, pelvic inflammatory diseases, immune response, humoral immunity, laser-magnetopuncture, reproductive function.

Одной из преобладающих патологий со стабильной частотой встречаемости в структуре гинекологической заболеваемости в настоящее время являются воспалительные заболевания органов малого таза (ВЗОМТ). «Затянувшаяся» воспалительная реакция во внутренних половых органах способствует нарушению не только менструальной функции, но и фертильности женщин в репродуктивном периоде [7, 8]. Регуляция воспалительного процесса в половых органах обеспечивается, в том числе, про- и противовоспалительными цитокинами, динамика продукции которых отражает особенности течения заболевания у конкретной больной [1, 2, 10]. Кроме того, индукция провоспалительных цитокинов запускает каскад реакций, направленных на инактивацию патогенных субстанций, обеспечивая, в частности, нейроиммуноэндокринные взаимодействия [13, 14, 15]. Использование физиотерапевтических процедур с целью оптимизации лечения больных с ВЗОМТ способствуют улучшению микроциркуляции и репаративных реакций, в регуляции которых большая роль принадле-

жит про- и противовоспалительным цитокинам [5, 6]. Современные преформированные факторы воздействия позволяют не только снизить медикаментозную нагрузку на организм женщины, но и предотвратить хронизацию воспалительного процесса и сохранить фертильность [11, 12]. Целью нашего исследования явилось изучение динамики продукции некоторых провоспалительных цитокинов у женщин с ВЗОМТ при включении в терапевтический комплекс комбинированных физических факторов воздействия.

Работа выполнена в дизайне открытого проспективного сравнительного исследования в параллельных группах. Критериями включения в исследования явились: клинико-лабораторные проявления острого воспаления во внутренних половых органах; возраст репродуктивного периода; информированное согласие пациентки на участие в проводимом исследовании. Обследовано 139 пациенток в возрасте от 19 до 35 лет, разделенных на 2 группы: основную — 72 пациентки и группу сравнения — 67 обследованных. Дополнительно сывороточный уро-

Таблица. Изменение концентрации цитокинов в динамике лечения

Table. Changes in the concentration of cytokines in the dynamics of treatment

Показатель, Me [Q1-Q3], пг/мл The indicator, Me [Q1-Q3], pg/ml		TNF α , пг/мл TNF α , pg/ml	IL-1 β , пг/мл IL-1 β , pg/ml	IL-6, пг/мл IL-6, pg/ml	IL-2, пг/мл IL-2, pg/ml
Контрольная группа Control group n = 20		77,3 [65–218]	51,9 [39–71]	9 [5–21] #2	10,03 [50–161]
Группа сравнения Comparison group n = 67	До лечения Before treatment	195,2 [171–358]	97,8 [87–218]	81,8 [65–501]	60,2 [44–408]
	После лечения After treatment	141,3 [97–205]*	82,6 [43–151]*	34,2 [24–307]*	51,9 [33–291]*
Основная группа Core group n = 72	До лечения Before treatment	191,1 [163–289]	94,8 [77–201]	88,12 [52–413]	61,8 [24–408]
	После лечения After treatment	98 [51–256]*, #1	63,5 [38–110]*	16 [11–46]*, #2	17,7 [14–207]*

Примечание. *p < 0,05 в сравнении с предыдущим исследованием (по критерию Вилкоксона); #1p < 0,05 при сравнении частоты значений < 100 пг/мл с группой сравнения (по критерию Фишера); #2p < 0,05 при сравнении частоты значений < 20 пг/мл с основной (по критерию Фишера).
Note. *p < 0.05 in comparison with the previous study (according to the Wilcoxon test); #1p < 0.05 when comparing the frequency of values < 100 pg/ml with the comparison group (according to the Fisher criterion); #2p < 0.05 when comparing the frequency values < 20 pg/ml with the main (according to Fisher criterion).

вень изучаемых цитокинов был определен у 20 здоровых женщин-добровольцев репродуктивного возраста, обратившихся за подбором метода контрацепции (контрольная группа).

Всем обследованным проводилась комплексная дезинтоксикационная, инфузионная, антибактериальная, противовоспалительная терапия в соответствии со стандартами и клиническими рекомендациями [4, 9]. В основной группе со вторых суток от начала терапии, применялось низкоинтенсивное лазерное излучение в постоянном магнитном поле на органоспецифические точки влагаллища аппаратом КАП-ЭЛМ-01 «Андрогин». Использовался влагаллищный датчик с воздействием лазера синфазно, непрерывно, длиной волны 0,85 мкм (полупроводникового) и 0,95 мкм (светодиодного), суммарной мощностью 7 мВт, с магнитной индукцией 15 мТл. Длительность воздействия — 10 мин на сеанс. Процедуры проводились ежедневно в утренние часы [3]. Курс лечения составил 5 дней. На проведение исследования получено разрешение регионального исследовательского этического комитета Волгоградской области (протокол № 211-2015 от 17.03.2015 г.).

Сывороточный уровень провоспалительных цитокинов [интерлейкины-1 β , -2 и -6 (IL-1 β , IL-2, IL-6), фактор некроза опухоли альфа (TNF α)] определяли методом иммуноферментного анализа (фотометр Multiskan Ascent, Thermo Electron (Финляндия); «Вектор-Бест»). Кровь набирали в сухую пробирку, после ее свертывания и ретракции сгустка центрифугировали при 3000 об./мин, дальнейшее хранение осуществляли при –20°C не более 2 месяцев. Исследование проводили при поступлении и на 7 сутки от начала терапии.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программного пакета «Statistica 6.0». Для количественной характеристики сывороточного уровня цитокинов использовали медианное значение (Me) с интерквартильным размахом [Q1–Q3], а достоверность различий оценивали по критерию Манна–Уитни (для несвязанных групп) или по критерию Вилкоксона (для динамических наблюдений). Для сравнения частот использовали точный критерий Фишера или χ^2 в зависимости от размера выборки сравниваемых показателей.

У всех обследованных пациенток до начала лечения выявлено увеличение концентраций провоспалительных цитокинов.

Так, значения IL-1 β > Me у пациенток с симптомами острого воспаления имели место достоверно чаще, чем в контрольной группе в целом — 7,2% (10/139 vs 10/20 (p > 0,0001)). Значения сывороточных уровней IL-2 и IL-6 выше 20 пг/мл отмечены у всех пациенток, что, соответственно, более чем в 6 (p = 0,0003) и 9 (p = 0,0424) раз выше, чем у здоровых женщин.

К 7 суткам от начала лечения у всех пациенток с острыми ВЗОМТ происходило снижение исследуемых цитокинов (p > 0,05), что, по-видимому, характеризовало разрешение воспалительного процесса (табл. 1).

Однако показатели основной группы в значительной степени отличались от цитокинового профиля обследованных группы сравнения. Так, в основной группе, сывороточное содержание TNF α > 100 пг/мл отмечалось у 43/72 vs 21/67 в группе сравнения (p = 0,0003). Обращала на себя внимание динамика сывороточного уровня IL-6, которая характеризовалась снижением его концентрации в обеих группах. Несмотря на отсут-

ствие достоверных различий между группами в целом, значения > 20 пг/мл, которые преобладают у здоровых женщин (70%; 14/20), в основной группе после лечения регистрировались с сопоставимой частотой (54,2%; 39/72, $p = 0,205$), что в 2,8 раза больше, чем в группе сравнения, где его значения достигали уровня здоровых к концу лечения достоверно реже (20,9%; 14/67, $p = 0,0001$). Сывороточные уровни IL-2 в исследуемых группах после лечения менее 100 пг/мл не выявлены ни в одном случае, но в основной группе этот показатель снизился в 3,5 раза от исходных значений, против 1,5 раз в группе сравнения ($p > 0,05$). Уровень IL-1 β , несмотря на свое снижение в раннем периоде ($p < 0,05$), сохранялся на уровне более 100 пг/мл у всех обследованных. Сывороточная концентрация IL-1 β у здоровых женщин ни в одном случае не превышала 100 пг/мл. У женщин с ВЗОМТ, несмотря на отсутствие достоверных отличий между группами, значения > 100 пг/мл имели место почти в половине случаев и сохранялись у 29,8% (20/67) больных группы сравнения и 23,6% (17/72) основной группы при сопоставимом характере динамики в целом. Подобный эффект, характеризующийся более динамичным снижением уровня провоспалительных цитокинов в сыворотке кро-

ви у пациенток основной группы, может быть связан с включением в комплексную терапию преформированных факторов воздействия, которые способствовали более быстрому разрешению воспалительного процесса.

Таким образом, комплексная медикаментозная терапия, способствующая улучшению клинического состояния больной с ВЗОМТ, сопровождается снижением содержания в сыворотке IL-1 β , IL-2, IL-6 и TNF α . Однако тот факт, что уровень указанных цитокинов не достигает уровня показателей здоровых женщин, позволяет высказать предположение о сохранении активности воспалительного процесса и необходимости продолжения лечения, в частности, проведения последующих реабилитационных мероприятий. Включение в терапевтический комплекс новой оригинальной лазеро-магнитной технологии ускоряет разрешение процесса воспаления, что наряду с клиническими данными ассоциируется с более выраженной динамикой маркерных цитокинов. Ускорение разрешения воспалительного процесса при ВЗОМТ снижает вероятность формирования соединительнотканых элементов и активизирует собственные репаративные и регенеративные процессы.

Список литературы/References

1. Белан Э.Б., Пахуридзе Р.Ф., Смолова Н.В., Андреева М.В. Уровень IL-8 в сыворотке крови как маркер течения воспалительного процесса у больных с гинекологической патологией // Цитокины и воспаление. 2011. Т. 10, № 3. С. 55–60. [Belan E.B., Pakhuridze R.F., Smolova N.V., Andreeva M.V. Serum Il-8 level as a marker of the inflammatory process in patients with gynecological pathology. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2011, vol. 10, no. 3, pp. 55–60. (In Russ.)]
2. Бурова Н.А. Современные особенности патогенеза воспалительных заболеваний органов малого таза у женщин (обзор) // Медицинский альманах. 2016. № 5 (45). С. 76–79. [Burova N.A. Modern features of the pathogenesis of inflammatory diseases of the pelvic organs in women (review). *Meditsinskiy al'manakh = Medical Almanac*, 2016, vol. 5, no. 45, pp. 76–79. doi: 10.21145/2499-9954-2016-5-76-79 (In Russ.)]
3. Жаркин Н.А. Вагинальная рефлексотерапия гинекологических заболеваний. Волгоград: ВолГМУ, 2014. 128 с. [Zharkin N.A. Vaginal reflexology of gynecological diseases. *Volgograd: VolgSMU*, 2014. 128 p. (In Russ.)]
4. Козлова Р.С., Духина А.О. Антибактериальная терапия воспалительных заболеваний органов малого таза без ошибок и экспериментов: методическое руководство для врачей // Под ред. В.Е. Радзинского. М.: Status Praesens, 2013. 16 с. [Kozlova R.S., Dukhina A.O. Antibacterial therapy of inflammatory diseases of the pelvic organs without errors and experiments: a methodological guide for doctors. Ed. V.E. Radzinskiy. *Moscow: Status Praesens*, 2013. 16 p. (In Russ.)]
5. Козырева Е.В., Давидян Л.Ю. Современные методы лечения хронического эндометрита (обзор литературы) // Лечащий врач. 2015. № 12. С. 8–11. [Kozyreva Ye.V., Davidyan L.Yu. Modern methods of treatment of chronic endometritis (literature review). *Lechashchii vrach = The Attending Physician*, 2015, no. 12, pp. 8–11. (In Russ.)]
6. Пестрикова Т.Ю., Юрасов И.В., Юрасова Е.А. Реабилитационная терапия как составляющая комплексного подхода к лечению хронических форм воспалительных заболеваний органов малого таза у женщин // Гинекология. 2018. Т. 20, № 5. С. 37–41. [Pestrikova T.Yu., Yurasov I.V., Yurasova E.A. Rehabilitation therapy as a component of an integrated approach to the treatment of chronic forms of inflammatory diseases of the pelvic organs in women. *Ginekologiya = Gynecology*, 2018, vol. 20, no. 5, pp. 37–41. doi: 10.26442/2079-5696_2018.5.37-41 (In Russ.)]
7. Пестрикова Т.Ю., Юрасов И.В., Юрасова Е.А. Современный взгляд на клиническое течение, диагностику и лечение воспалительных заболеваний органов малого таза у женщин // Российский вестник акушера-гинеколога. 2015. Т. 15, № 4. С. 23–28. [Pestrikova T.Ju., Jurasov I.V., Jurasova E.A. Modern view on the clinical course, the diagnosis and treatment of inflammatory diseases of the pelvic organs in women. *Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa = Russian Bulletin of Obstetrician-Gynecologist*, 2015, vol. 15, iss. 4, pp. 23–28. doi: 10.17116/rosakush201515423-28 (In Russ.)]
8. Прилепская В.Н., Сехин С.В. Воспалительные заболевания органов малого таза: диагностика и тактика ведения больных // Российский вестник акушера-гинеколога. 2015. Т. 15, № 4. С. 101–106. [Prilepskaya V.N., Sekhin S.V. Inflammatory diseases of the pelvic organs: diagnosis and management of patients. *Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa = Russian Bulletin of Obstetrician-Gynecologist*, 2015, vol. 15, no. 4, pp. 101–106. doi: 10.17116/rosakush2015154101-106. (In Russ.)]

9. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 01.11.2012 № 572н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю «акушерство и гинекология (за исключением использования вспомогательных репродуктивных технологий)». [Order of the Ministry of health of the Russian Federation dated 01.11.2012 No. 572n "On approval of the Procedure of rendering of medical aid according to the specialty "obstetrics and gynecology (with the exception of the use of assisted reproductive technologies)".]
10. Прокопец В.И., Стрижак Д.А. Женское бесплодие воспалительного генеза // Молодой ученый. 2016. № 22.1. С. 31–34. [Prokopets V.I., Strizhak D.A. Female infertility of inflammatory genesis. *Molodoy uchenyy = Young Scientist*, 2016, no. 22.1, pp. 31–34. (In Russ.)]
11. Трунченко Н.В., Макаров К.Ю., Соколова Т.М., Маринкин И.О. Сравнительная оценка клинической эффективности комплексной терапии хронического эндометрита с использованием пелоидов озера Карачи // Мать и дитя в Кузбасе. 2016. № 4 (67). С. 19–23. [Trunchenko N.V., Makarov K.Yu., Sokolova T.M., Marinkin I.O. Comparative evaluation of the clinical efficacy of complex therapy of chronic endometritis using peloids of Karachi Lake. *Mat' i ditya v Kuzbass = Mother and Child in Kuzbass*, 2016, no. 4 (67), pp. 19–23. (In Russ.)]
12. Фадеева Н.И., Скоропатская О.А., Левченко И.М., Кузнецова Т.А., Маркова Е.А. Прегавидарная подготовка пациенток с хроническим эндометритом и ее эффективность // Мать и дитя в Кузбасе. 2017. № 1 (68). С. 24–27. [Fadeeva N.I., Skoropatskaya O.A., Levchenko I.M., Kuznetsova T.A., Markova E.A. Pregravid training of patients with chronic endometritis and its effectiveness. *Mat' i ditya v Kuzbass = Mother and Child in Kuzbass*, 2017, no. 1 (68), pp. 24–27. (In Russ.)]
13. Эллиниди В.Н., Феоктистов А.А., Лямина А.В., Обидняк Д.М., Суворова И.Ю. Хронический полипоидный и лимфофолликулярный эндометрит: гистероскопическая и гистологическая диагностика // Журнал акушерства и женских болезней. 2017. Т. 66, № 6. С. 59–65. [Ellinidi V.N., Feoktistov A.A., Lyamina A.V., Obidnyak D.M., Suvorova I.Yu. Chronic polypoid and lymphofollicular endometritis: hysteroscopic and histological diagnostics. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney = Journal of Obstetrics and Female Diseases*, 2017, vol. 66, no. 6, pp. 59–65. doi: 10.17816/JOWD66659-65 (In Russ.)]
14. Bouet P., Nache H., Monceau E., Gariépy G., Kadoch I.J., Sylvestre C. Chronic endometritis in women with recurrent pregnancy loss and recurrent implantation failure: prevalence and role of office hysteroscopy and immunohistochemistry in diagnosis. *Fertil. Steril.*, 2016, vol. 105, no. 1, pp. 106–110. doi: 10.1007/s13669-017-0189-z
15. Cicinelli E., Matteo M., Tinelli R., Lepera A., Alfonso R., Indraccolo U., Marrocchella S., Greco P., Resta L. Prevalence of chronic endometritis in repeated unexplained implantation failure and the IVF success rate after antibiotic therapy. *Hum. Reprod.*, 2015, vol. 30, no. 2, pp. 323–330. doi: 10.1007/978-3-319-57559-9_57

Авторы:

Бурова Н.А., к.м.н., доцент кафедры акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО Волгоградский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Волгоград, Россия;
Солтыс П.А., ассистент кафедры акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО Волгоградский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Волгоград, Россия;
Жаркин Н.А., д.м.н., профессор, зав. кафедрой акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО Волгоградский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Волгоград, Россия;
Селихова М.С., д.м.н., профессор кафедры акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО Волгоградский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Волгоград, Россия;
Свиридова Н.И., PhD, д.м.н., профессор кафедры акушерства и гинекологии ФУВ ФГБОУ ВО Волгоградский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Волгоград, Россия;
Белан Э.Б., д.м.н., профессор, зав. кафедрой иммунологии и аллергологии ФУВ ФГБОУ ВО Волгоградский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Волгоград, Россия.

Authors:

Burova N.A., PhD (Medicine), Associate Professor of the Department of Obstetrics and Gynecology, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation;
Soltys P.A., Assistant Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation;
Zharkin N.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Obstetrics and Gynecology, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation;
Selikhova M.S., PhD, MD (Medicine), Professor of the Department of Obstetrics and Gynecology, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation;
Sviridova N.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Advanced Medical Training, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation;
Belan E.B., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Immunology and Allergology, Faculty of Advanced Medical Training, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation.

Поступила в редакцию 27.12.2018
 Отправлена на доработку 13.03.2019
 Принята к печати 22.03.2019

Received 27.12.2018
 Revision received 13.03.2019
 Accepted 22.03.2019

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

Абдурасулова И.Н.	504	Замятина Е.В.	600	Майстровская О.С.	559	Стасенко В.Л.	531
Андреев Ю.Ю.	607	Зеткин А.Ю.	607	Марьин М.А.	495	Степанова Л.А.	485
Архарова Г.В.	583	Зурочка А.В.	549	Мацулевич А.В.	504	Степанова Т.Ф.	568
Бакштановская И.В.	568	Зурочка В.А.	549	Меликян С.Г.	549	Столяров И.Д.	504
Бардышева Н.А.	523	Ибрагимова М.К.	595	Мокроусов И.В.	531	Суворов А.Н.	457, 504
Барышникова Н.В.	457	Ивашкова Е.В.	504	Мунтян Я.О.	495	Тарасова Е.А.	504
Бекенова Д.С.	577	Ильвес А.Г.	504	Назарбаева Ж.Н.	577	Татаринова А.Е.	504
Белан Э.Б.	612	Ильинских Е.Н.	600	Нгуен Т.Т.Т.	467	Татаринцева М.П.	531
Беленюк В.Д.	539	Ильинских Н.Н.	600	Негореева И.Г.	504	Тобокалова С.Т.	577
Беляков С.И.	607	Исмагуллин Д.Д.	429	Никитина Т.Р.	429	Топтыгина А.П.	607
Бичурина М.А.	467	Канаева О.И.	467	Новикова Н.А.	467	Трофимов А.Р.	429
Блох А.И.	531	Карцева А.С.	495	Ногойбаева К.А.	577	Тузанкина И.А.	549
Богословский М.М.	523	Катаева Н.Н.	549	Пасечник О.А.	531	Успенский Ю.П.	457
Борисов А.Г.	539	Клименко В.М.	504	Подсевалов В.С.	429	Фирстова В.В.	495
Брезгин С.А.	476	Клыкова Т.Г.	607	Ребешенко А.П.	568	Цыбалова Л.М.	485
Бурова Н.А.	612	Коломиец Л.А.	595	Романенкова Н.И.	467	Цыганов М.М.	595
Бывалов А.А.	437	Контаров Н.А.	583	Рябко А.К.	495	Чистяков Д.С.	476
Волчкова Е.В.	476	Конышев И.В.	437	Савченко А.А.	539	Чуланов В.П.	476
Ву Л.Т.	467	Коротков А.В.	485	Санина Н.М.	559	Чуруксаева О.Н.	595
Вязовая А.А.	531	Костюшев Д.С.	476	Саркисян Н.Г.	549	Шемякин И.Г.	495
Голицына Л.Н.	467	Костюшева А.П.	476	Сварваль А.В.	457	Шукина М.А.	485
Гришунина С.А.	583	Котляров Р.Ю.	485	Свиридова Н.И.	612	Эллиниди В.Н.	523
Гришунина Ю.Б.	583	Кудрявцев И.В.	504, 539	Селихова М.С.	612	Юминова Н.В.	583
Грищенко В.И.	485	Леонова Г.Н.	559	Сенникова С.В.	607	Antipova A.Yu.	449
Дрыгина Л.Б.	523	Ли С.В.	600	Серебрякова М.К.	504	Bichurina M.A.	449
Дымова М.А.	531	Литвяков Н.В.	595	Силкина М.В.	495	Samara J.	449
Ермоленко Е.И.	457, 504	Лубова В.А.	559	Симирский В.Н.	476	Lavrentieva I.N.	449
Жаркин Н.А.	612	Льонг М.Т.	467	Синицын Б.Ф.	589	Magassouba N.	449
Жестков А.В.	429	Лямин А.В.	429	Смердова М.А.	607	Zarubaev V.V.	449
Зайцева М.В.	485	Мазуркевич В.В.	568	Солтыс П.А.	612		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

адгезины	437	классификация	429	псориаз	589
адгезионные рецепторы	539	клетки памяти	495	псориазический антиген	589
активационные маркеры	539	клеточный иммунитет	607	рак шейки матки	595
аналог <i>PrP^{Sc}</i>	589	клещевой энцефалит	600	рассеянный склероз	504
антибактериальное действие	549	клиника	577	ревакцинация	449
антибиотикорезистентность	429	клиническое значение	429	рекомбинантная вакцина	485
антитела	495, 523, 607	кольцевая ковалентно		репродуктивная функция	612
Африка	449	замкнутая ДНК	476	рецептор	437
ацидин-пепсин	589	корь	449, 607	серомониторинг	607
белок НВх	476	краснуха	607	сибирская язва	495
буккальный эпителий	600	Кыргызстан	577	синтетический пептид	549
вакцина	495	лабораторные показатели	577	сквамозные элементы	589
вакцинация	449	лазеро-магнитопунктура	612	слизистая оболочка желудка	523
вакцины	457	лекарственная устойчивость	531	Т-хелперы	504
вирус гепатита В	476	летальный исход	531	физико-химические свойства	549
вирус клещевого энцефалита	559	летальный фактор	495	филогенетический анализ	467
вирус папилломы человека	595	математическая модель SIR+A	583	хронический вирусный гепатит В	577
вирусная нагрузка	577, 595	медицинские работники	568	хронический вирусный гепатит В	
воспалительные заболевания		микробактерии	568	с дельта-агентом	577
органов малого таза	612	микроядерный анализ	600	циркуляция	467
выживаемость	595	молекулярно-генетические		цитокинез-блокированные	
высокий канцерогенный риск	595	исследования	568	лимфоциты	600
генотип	531	мутантные формы белка НВх	476	цитокины	612
гордонии	429	нозокомиальный туберкулез	568	цитотоксины <i>Sag</i>	457
грипп	583	нокардии	429	экспериментальные животные	485
грипп А	485	онкопротеин Ki-67	523	экспериментальный	
гуморальный иммунитет	612	онкопротеин Bcl-2	523	аутоиммунный энцефаломиелит	504
детекция	467	онкопротеин c-erbB-2	523	энтеровирусная инфекция	467
динамика нейтрализации вируса		онкопротеин p16	523	энтеровирусы	467
<i>in vitro, ex vivo, in vivo</i>	559	ОРВИ	583	энтерококки	457
дисбиоз	504	оценка	583	эпидемиологическая безопасность	
дооперационный период	539	пепсиновый гидролиз	589	медицинской деятельности	568
заболеваемость	577, 583	пепсиноген I	523	эрадикация	523
заболевание пародонта	549	пепсиноген II	523	эукариотическая клетка	437
защитный титр антител	559	перитонит	539	Beijing	531
иммунизация	457	популяционный иммунитет	607	CRISPR/Cas9	476
иммунный ответ	485, 612	послеоперационное лечение	539	DP Th17	504
иммунорегуляция	504	пробиотики	457	<i>GSTM1</i>	600
иммунотропная активность	549	прогноз	583, 595	<i>GSTT1</i>	600
инфекционные прионные белки	589	программа элиминации кори	449	<i>Helicobacter pylori</i>	457, 523
исход заболевания	539	протективный антиген	495	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	531
кишечная микробиота	504	проточная цитометрия	495	НК-клетки	539
				<i>PrP^{Sc}</i>	589
				<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	437