

# ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

октябрь–декабрь  
2020, том 10

№ 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

<b>Алешкин В.А.</b>	д.б.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, научный руководитель Московского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия
<b>Бухарин О.В.</b>	д.м.н., профессор, академик РАН, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург, Россия
<b>Вишневский Б.И.</b>	д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела лабораторной диагностики Санкт-Петербургского НИИ фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия
<b>Долгушин И.И.</b>	д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, президент Южно-Уральского государственного медицинского университета, Челябинск, Россия
<b>Зверев В.В.</b>	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
<b>Зуева Л.П.</b>	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
<b>Кафтырева Л.А.</b>	д.м.н., профессор, зав. лабораторией кишечных инфекций Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
<b>Кашкин К.П.</b>	д.м.н., профессор, академик РАН, профессор кафедры иммунологии Российской медицинской академии последипломного образования МЗ РФ, Москва, Россия
<b>Кубарь О.И.</b>	д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
<b>Малеев В.В.</b>	д.м.н., профессор, академик РАН, советник директора Центрального НИИ эпидемиологии, зав. отделом инфекционной патологии, Москва, Россия
<b>Нарвская О.В.</b>	д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
<b>Савичева А.М.</b>	д.м.н., профессор, зав. лабораторией микробиологии НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия
<b>Сельков С.А.</b>	д.м.н., профессор, зав. лабораторией иммунологии НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия
<b>Тец В.В.</b>	д.м.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии и вирусологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия
<b>Харит С.М.</b>	д.м.н., профессор, руководитель отдела профилактики инфекционных заболеваний ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА, Санкт-Петербург, Россия
<b>Чекнев С.Б.</b>	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
<b>Шкарин В.В.</b>	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](http://www.iimmun.ru) и [www.elibrary.ru](http://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](mailto:izdatelstvo@pasteurorg.ru)

### Типография ООО «Аллегро»

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

Подписано в печать 05.11.2020 г. Формат 60 x 90 1/8.  
Печать офсетная. Усл.-печ. л. 25,25.  
Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.).  
Заказ № 1341

© Инфекция и иммунитет  
© Северо-Западное отделение медицинских наук, 2020  
© НИИЭМ имени Пастера, 2020  
© СПб РО РААКИ, 2020

---

# Russian Journal of Infection and Immunity

## (Infektsiya i immunitet)

October–December

2020, volume 10

No. 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, 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

<b>Vladimir A. Aleshkin</b>	PhD, MD (Biology), Professor, G.N. Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Scientific Director, Moscow, Russian Federation
<b>Oleg V. Bukharin</b>	PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Research Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Scientific Director, Orenburg, Russian Federation
<b>Boris I. Vishnevsky</b>	PhD, MD (Medicine), Professor, Research Institute of Phthisiopulmonology, Head Researcher, Department of Laboratory Diagnostic, St. Petersburg, Russian Federation
<b>Ilija I. Dolgushin</b>	PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Chelyabinsk State Medical Academy, President, Moscow, Russian Federation
<b>Vitaly V. Zverev</b>	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
<b>Ludmila P. Zueva</b>	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
<b>Lidiia A. Kaftyreva</b>	PhD, MD (Medicine), Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Head of the Laboratory of Intestinal Infections, St. Petersburg, Russian Federation
<b>Kirill P. Kashkin</b>	PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Russian Academy of Postgraduate Medical Education, Professor of the Department of Immunology, Moscow, Russian Federation
<b>Olga I. Kubar</b>	PhD, MD (Medicine), Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Leading Researcher, St. Petersburg, Russian Federation
<b>Victor V. Maleev</b>	PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Central Research Institute of Epidemiology, Adviser of the Director, Moscow, Russian Federation
<b>Olga V. Narvskaya</b>	PhD, MD (Medicine), Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, St. Petersburg, Leading Researcher, Russian Federation
<b>Alevtina M. Savicheva</b>	PhD, MD (Medicine), Professor, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Head of the Laboratory of Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation
<b>Sergei A. Selkov</b>	PhD, MD (Medicine), Professor, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Head of the Laboratory of Immunology, St. Petersburg, Russian Federation
<b>Viktor V. Tets</b>	PhD, MD (Medicine), Professor, Pavlov State Medical University, Head of the Department of Microbiology and Virology, St. Petersburg, Russian Federation
<b>Susanna M. Kharit</b>	PhD, MD (Medicine), Professor, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Head of the Prevention Department of Infectious Diseases, St. Petersburg, Russian Federation
<b>Sergei B. Cheknev</b>	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
<b>Vyacheslav V. Shkarin</b>	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](http://www.iimmun.ru) and [www.elibrary.ru](http://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](mailto: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 05.11.2020. Print format 60 x 90 1/8.  
Offset printing. Printed sheets 25,25.  
Circulation 2000 copies. (1<sup>st</sup> edition – 1000 copies).

© Russian Journal of Infection and Immunity =  
Infektsiya i immunitet

© North-West Regional Branch of Medical Sciences, 2020

© St. Petersburg Pasteur Institute, 2020

© SPb RAACI, 2020

# СОДЕРЖАНИЕ

## Обзоры

Долгушин И.И., Мезенцева Е.А.

<b>НЕЙТРОФИЛЬНЫЕ ГРАНУЛОЦИТЫ: УЧАСТИЕ В ГОМЕОСТАТИЧЕСКИХ И РЕПАРАТИВНЫХ ПРОЦЕССАХ. ЧАСТЬ I</b> .....	609
--	-----

Алексеева Л.А., Железникова Г.Ф., Горелик Е.Ю., Скрипченко Н.В., Жирков А.А.

<b>ЦИТОКИНЫ И НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ БЕЛКИ ПРИ ВИРУСНЫХ ЭНЦЕФАЛИТАХ И СУДОРОЖНОМ СИНДРОМЕ У ДЕТЕЙ. I. ВИРУСНЫЕ ЭНЦЕФАЛИТЫ</b> .....	625
---	-----

Мелешко А.А., Афиногенова А.Г., Афиногенов Г.Е., Спиридонова А.А., Толстой В.П.

<b>АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ НЕОРГАНИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ: ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ СИСТЕМ</b> .....	639
--	-----

Томи Р., Асгари Н., Хаджихейдари А., Эстеки Р., Бийабанаки Ф., Насиринасаб Ф.

<b>ПАНДЕМИЯ COVID-19: СИСТЕМАТИЧЕСКИЙ ОБЗОР СОВРЕМЕННЫХ ДАННЫХ</b> .....	655
--	-----

Токмалаев А.К., Кожевникова Г.М., Завойкин В.Д., Тумольская Н.И., Половинкина Н.А., Коннов В.В., Голуб В.П., Харламова Т.В., Емероле К.Ч.

<b>СТРОНГИЛОДОЗ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ: ВОПРОСЫ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ (КРАТКИЙ ОБЗОР И КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ)</b> .....	664
--	-----

## Оригинальные статьи

Букина Ю.В., Федонюк Л.Я., Коваль Г.Д., Шеховцева Ю.А., Камышный А.М., Губарь А.А., Губка В.А.

<b>САЛЬМОНЕЛЛА-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ КЛЮЧЕВЫХ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ БАКТЕРИЙ ВЛИЯЮТ НА ТРАНСКРИПЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ <i>Foxp3</i> И <i>ROryt</i> В КИШЕЧНО-АССОЦИИРОВАННОЙ ЛИМФОИДНОЙ ТКАНИ КРЫС</b> .....	671
---	-----

Косова А.А., Башкирова Е.С., Машин Т.И., Чалала В.И.

<b>МЕТААНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПЕНТАВАЛЕНТНОЙ ЖИВОЙ ОРАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ТЯЖЕЛЫХ ФОРМ РОТАВИРУСНОГО ГАСТРОЭНТЕРИТА У ДЕТЕЙ</b> .....	686
--	-----

Столбиков А.С., Салаяев Р.К., Рекославская Н.И.

<b>БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВОЗМОЖНОЙ ПРИЧИНЫ ПЕРЕКРЕСТНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АНТИТЕЛ С АНТИГЕНАМИ, ПРИНАДЛЕЖАЩИМИ К РАЗНЫМ ПАТОГЕННЫМ ТИПАМ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА</b> .....	695
--	-----

Филатова Е.Н., Сахарнов Н.А., Уткин О.В., Кулова Е.А.

<b>ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ТЯЖЕЛОЙ ФОРМЫ ТЕЧЕНИЯ ВЭБ-МОНОНУКЛЕОЗА</b> .....	707
---	-----

Мамаева Т.А., Железнова Н.В., Бичурина М.А., Наумова М.А., Говорухина М.В., Топтыгина А.П.

<b>ОЦЕНКА ВОЗРАСТНОЙ СТРУКТУРЫ БОЛЬНЫХ КОРЬЮ С ПЕРВИЧНЫМ И ВТОРИЧНЫМ ИММУННЫМ ОТВЕТом ЗА ПЕРИОД 2010–2016 гг. В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ</b> .....	717
--	-----

Стоилькович В., Бичурина М.А., Лаврентьева И.Н., Филипович-Вигньевич С., Банчевич М., Железнова Н.В., Антипова А.Ю.

<b>ПОДЪЕМ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ КОРЬЮ В РЕСПУБЛИКЕ СЕРБИЯ И НА СЕВЕРО-ЗАПАДЕ РОССИИ В 2017–2018 ГОДАХ</b> .....	729
--	-----

Дубянский В.М., Волынкина А.С., Анисимов А.П.

<b>VNTR ЛОКУСЫ КАК ИНДИКАТОРЫ ПРОЛИНЗАВИСИМЫХ ШТАММОВ МИКРОБА ЧУМЫ (<i>YERSINIA PESTIS</i>) В ЦЕНТРАЛЬНО-КАВКАЗСКОМ ВЫСОКОГОРНОМ ПРИРОДНОМ ОЧАГЕ ЧУМЫ</b> .....	735
---	-----

Смирнова О.В., Синяков А.А., Титова Н.М.

<b>СОСТОЯНИЕ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ГАСТРИТАХ, АССОЦИИРОВАННЫХ С <i>HELICOBACTER PYLORI</i>-ИНФЕКЦИЕЙ, У МУЖЧИН СРЕДНЕГО ВОЗРАСТА</b> .....	741
---	-----

<i>Любимова А.В., Бродина Т.В., Гончаров А.Е., Силин А.В., Зуева Л.П., Климова Е.А., Белова Л.В.</i>	
<b>РОЛЬ ИНФЕКЦИОННОГО АГЕНТА В РАЗВИТИИ ПОРАЖЕНИЯ ЗУБОВ .....</b>	<b>747</b>
<i>Чухраев А.М., Агарков Н.М., Коняев Д.А., Попова Е.В., Яблоков М.М., Кулабухов А.С.</i>	
<b>ИНФОРМАТИВНОСТЬ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ В ДИАГНОСТИКЕ И РАЗВИТИИ ЗАКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМЫ В ПОЖИЛОМ ВОЗРАСТЕ .....</b>	<b>755</b>
<b>Краткие сообщения</b>	
<i>Ткаченко Л.В., Свиридова Н.И., Жаркин Н.А., Бурова Н.А., Белан Э.Б.</i>	
<b>ОЦЕНКА ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА У ПАЦИЕНТОК С ХРОНИЧЕСКИМ ЭНДОМЕТРИТОМ В СОЧЕТАНИИ С ГИПЕРПЛАСТИЧЕСКИМИ ПРОЦЕССАМИ ЭНДОМЕТРИЯ В РЕПРОДУКТИВНОМ ПЕРИОДЕ .....</b>	<b>762</b>
<i>Зырянова Д.П., Богачева Н.В., Тотменин А.В., Гашникова Н.М.</i>	
<b>МОДЕЛИ CRF63_02A6 ВИЧ-1 КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗРАБАТЫВАЕМЫХ АНТИРЕТРОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ .....</b>	<b>769</b>
<i>Пузырева Л.В., Мордык А.В., Панева М.А.</i>	
<b>КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПНЕВМОНИЙ НА ФОНЕ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ И ИХ СВЯЗЬ С НАЛИЧИЕМ ИЛИ ОТСУТСТВИЕМ АКТИВНОЙ НАРКОТИЧЕСКОЙ ЗАВИСИМОСТИ .....</b>	<b>775</b>
<i>Маркелова О.А., Везикова Н.Н., Зильбер Э.К.</i>	
<b>СРАВНИТЕЛЬНАЯ РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ АТОПИЧЕСКОЙ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ НА ПРИГРАНИЧНЫХ ТЕРРИТОРИЯХ ДВУХ ГОСУДАРСТВ – РОССИИ И ФИНЛЯНДИИ .....</b>	<b>782</b>
<i>Немати М., Данеш Пойа Ф., Рохни Асл Е., Расми Ю.</i>	
<b>ПАРТЕНОЛИД: ВОЗМОЖНОЕ ЛЕКАРСТВО ОТ COVID-19 .....</b>	<b>789</b>
<b>Методы</b>	
<i>Бухарин О.В., Перунова Н.Б., Чайникова И.Н., Иванова Е.В., Андрющенко С.В.</i>	
<b>УСКОРЕННЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ «СВОЙ–ЧУЖОЙ» МИКРООРГАНИЗМОВ В РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ .....</b>	<b>792</b>
<b>Некролог</b>	
<b>ПАМЯТИ ВАЛЕНТИНА ИВАНОВИЧА ПОКРОВСКОГО .....</b>	<b>797</b>
<b>Правила для авторов .....</b>	<b>801</b>
<b>Авторский указатель .....</b>	<b>802</b>
<b>Предметный указатель .....</b>	<b>802</b>

# CONTENTS

## Reviews

*Dolgushin I.I., Mezentseva E.A.*

**NEUTROPHIL GRANULOCYTES: PARTICIPATION IN HOMEOSTATIC AND REPARATIVE PROCESSES. PART I** ..... 609

*Alekseeva L.A., Zheleznikova G.F., Gorelik E.Y., Skripchenko N.V., Zhirkov A.A.*

**CYTOKINES AND NEURON-SPECIFIC PROTEINS IN PEDIATRIC VIRAL ENCEPHALITIS AND CONVULSIVE SYNDROME. I. VIRAL ENCEPHALITIS** ..... 625

*Meleshko A.A., Afinogenova A.G., Afinogenov G.E., Spiridonova A.A., Tolstoy V.P.*

**ANTIBACTERIAL INORGANIC AGENTS: EFFICIENCY OF USING MULTICOMPONENT SYSTEMS** ..... 639

*Ghomi R., Asgari N., Hajjheydari A., Esteki R., Biyabanaki F., Nasirinasab F.*

**THE COVID-19 PANDEMIC: A SYSTEMATIC REVIEW OF THE CURRENT EVIDENCE** ..... 655

*Tokmalaev A.K., Kozhevnikova G.M., Zavoikin V.D., Tumolskaya N.I., Polovinkina N.A., Konnov V.V., Golub V.P., Kharlamova T.V., Emerole K.C.*

**STRONGYLOIDIASIS IN CLINICAL PRACTICE: CHALLENGES IN DIAGNOSTICS AND TREATMENT (BRIEF REVIEW AND CLINICAL OBSERVATIONS)** ..... 664

## Original articles

*Bukina Yu.V., Fedoniuk L.Ya., Koval G.D., Shekhovtsova Iu.O., Kamyshnyi A.M., Gubar A.O., Gubka V.O.*

**SALMONELLA-INDUCED CHANGES IN THE LEVEL OF KEY IMMUNOREGULATORY BACTERIA AFFECT THE TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY OF THE *Foxp3* AND *ROR $\gamma$ t* GENES IN THE GUT-ASSOCIATED LYMPHOID TISSUE OF RATS** ..... 671

*Kosova A.A., Bashkirova E.S., Mashin T.I., Chalapa V.I.*

**META-ANALYSIS OF THE EFFECTIVENESS OF PENTAVALENT LIVE ORAL VACCINE FOR THE PREVENTION OF SEVERE FORMS OF ROTAVIRUS GASTROENTERITIS IN CHILDREN** ..... 686

*Stolbikov A.S., Salyaev R.K., Rekoslavskaya N.I.*

**BIOINFORMATICS ANALYSIS OF PUTATIVE CAUSES FOR CROSS-REACTIVE ANTIBODIES INTERACTING WITH ANTIGENS DERIVED FROM VARIOUS PATHOGENIC HUMAN PAPILLOMAVIRUSES** ..... 695

*Filatova E.N., Sakharnov N.A., Utkin O.V., Kulova E.A.*

**DETERMINING MOLECULAR AND GENETIC MARKERS FOR SEVERE EBV-MONONUCLEOSIS** ..... 707

*Mamaeva T.A., Zheleznova N.V., Bichurina M.A., Naumova M.A., Govorukhina M.V., Toptygina A.P.*

**EVALUATION OF AGE-RELATED DISTRIBUTION OF MEASLES CASES WITH PRIMARY AND SECONDARY IMMUNE RESPONSE IN RUSSIAN FEDERATION, 2010–2016** ..... 717

*Stoiljkovic V., Bichurina M.A., Lavrentieva I.N., Filipovic-Vignjevic S., Bancevic M., Zheleznova N.V., Antipova A.Yu.*

**RISE IN 2017–2018 MEASLES MORBIDITY IN SERBIA AND NORTHWEST RUSSIA** ..... 729

*Dubyanskiy V.M., Volynkina A.S., Anisimov A.P.*

**VNTR LOCI AS INDICATORS OF PROLINE-DEPENDENT PLAGUE MICROBE STRAINS (*YERSINIA PESTIS*) IN THE CENTRAL CAUCASIAN MOUNTAIN NATURAL PLAGUE FOCUS** ..... 735

*Smirnova O.V., Sinyakov A.A., Titova N.M.*

**STATE OF LIPID PEROXIDATION AND ANTIOXIDANT DEFENSE IN CHRONIC GASTRITIS ASSOCIATED WITH *HELICOBACTER PYLORI*-INFECTION IN MIDDLE-AGED MALES** ..... 741

*Liubimova A.V., Brodina T.V., Goncharov A.E., Silin A.V., Zueva L.P., Klimova E.A., Belova L.V.*

**THE ROLE OF INFECTIOUS AGENT IN DEVELOPMENT OF TOOTH DECAY** ..... 747

*Chukhraev A.M., Agarkov N.M., Konyaev D.A., Popova E.V., Yablokov M.M., Kulabukhov A.S.*

**INFERNATIVITY LACRIMAL FLUID INTERLEUKINS IN DIAGNOSTICS AND DEVELOPMENT OF ANGLE-CLOSURE GLAUCOMA IN ELDERLY SUBJECTS** ..... 755

## Short communications

*Tkachenko L.V., Sviridova N.I., Zharkin N.A., Burova N.A., Belan E.B.*

**ASSESSING CYTOKINE STATUS OF PATIENTS WITH CHRONIC ENDOMETRITIS COMBINED WITH ENDOMETRIAL HYPERPLASTIC PROCESSES IN REPRODUCTIVE PERIOD ..... 762**

*Zyryanova D.P., Bogacheva N.V., Totmenin A.V., Gashnikova N.M.*

**HIV-1 CRF63\_02A6 MODELS AS A TOOL FOR EVALUATING EFFICACY OF DEVELOPING ANTIRETROVIRAL DRUGS ..... 769**

*Puzryyova L.V., Mordyk A.V., Paneva M.A.*

**CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL CHARACTERISTICS OF BACTERIAL PNEUMONIA ASSOCIATED WITH HIV INFECTION COUPLED TO DRUG ADDICTION ..... 775**

*Markelova O.A., Vezikova N.N., Zilber E.K.*

**COMPARATIVE PREVALENCE OF ATOPIC SENSITIZATION IN THE BORDER AREAS BETWEEN RUSSIA AND FINLAND ..... 782**

*Nemati M., Danesh Pouya F., Roshni Asl E., Rasmi Y.*

**PARTHENOLIDE: SUGGESTED DRUG FOR COVID-19 ..... 789**

## Methods

*Bukharin O.V., Perunova N.B., Chainikova I.N., Ivanova E.V., Andryushchenko S.V.*

**AN ACCELERATED METHOD FOR DETERMINING «SELF/NON-SELF» MICROORGANISMS IN THE AGGLUTINATION REACTION ..... 792**

## Obituary

**IN MEMORY OF VALENTIN V. POKROVSKIY ..... 797**

**Instructions to Authors ..... 801**

**Author index ..... 802**

**Subject index ..... 802**

# НЕЙТРОФИЛЬНЫЕ ГРАНУЛОЦИТЫ: УЧАСТИЕ В ГОМЕОСТАТИЧЕСКИХ И РЕПАРАТИВНЫХ ПРОЦЕССАХ. ЧАСТЬ I

И.И. Долгушин, Е.А. Мезенцева

ФГБОУ Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Челябинск, Россия

**Резюме.** После выхода из костного мозга (КМ) в кровообращение зрелые нейтрофильные гранулоциты в отсутствие воспаления претерпевают ряд фенотипических и физиологических изменений, в комплексе названных «старением», конститутивно получая праймирующие сигналы от комменсальной микробиоты и приобретая большую функциональную готовность в случае активации при травматизации тканей или инвазии патогенов. Физиологическое старение нейтрофилов в крови и последующее их возвращение в КМ генерирует сигналы, модулирующие размер и функции гомеопатической ниши. Циркадная физиологическая инфильтрация КМ нейтрофилами содействует поддержанию базового уровня внекостномозговых гомеопатических клеток-предшественников, обладающих функциями регенерации и иммунного наблюдения. Помимо КМ, нейтрофилы активно проникают и в другие здоровые ткани, вероятно, оказывая действие на их базальную физиологию. На примере легочной ткани показано, что нейтрофилы могут «управлять» работой ряда генов, регулирующих клеточный рост, миграцию, пролиферацию, дифференцировку клеток и канцерогенез. Нейтрофильные гранулоциты принимают участие в деструкции эндометриальных тканей во время фазы десквамации, в последующей их репарации и физиологическом ангиогенезе в пролиферативной фазе менструального цикла; участвуют в процессе разрыва стенки преовуляторного фолликула яичников и выхода ооцита; способствуют деградации и рассасыванию желтого тела при ненаступлении беременности; играют важную физиологическую роль в ремоделировании сосудов беременной матки и формировании материнской иммунной толерантности по отношению к полуаллогенному плоду. При инфекции и/или повреждении слизистой оболочки кишечника активно мигрирующие на поверхность кишечного эпителия нейтрофилы стимулируют реституцию эпителия и восстановление его барьерной функции. Рекрутированные в ротовую полость нейтрофилы регулируют количественный и качественный состав микробных сообществ оральных биопленок, отвечают за обеспечение здоровья пародонтальных структур. Являясь основным участником и регулятором заживления кожных ран на ранней стадии, стадии воспаления, нейтрофилы не только уничтожают возможных патогенов, но также участвуют в очищении раны от клеточного дебриса, генерируют цитокины, ферменты, ростовые факторы, влияющие на дальнейшие этапы процесса репарации. И апоптоз, и нетоз, являясь механизмами гибели нейтрофилов, вносят огромный вклад в процесс заживления ран. Однако дисрегуляция и нарушение баланса как апоптоза, так и нетоза могут приводить к негативным последствиям с формированием хронических, длительно незаживающих ран.

**Ключевые слова:** нейтрофильные гранулоциты, жизненный цикл, гомеостаз, репарация, кожа, легкие, ротовая полость, кишечник, женский репродуктивный тракт.

---

**Адрес для переписки:**

Мезенцева Елена Анатольевна  
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64,  
ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России.  
Тел.: 8 902 892-28-43.  
E-mail: alena\_mez\_75@mail.ru

**Contacts:**

Elena A. Mezentseva  
454092, Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovskogo str., 64,  
South-Ural State Medical University.  
Phone: +7 902 892-28-43.  
E-mail: alena\_mez\_75@mail.ru

**Библиографическое описание:**

Долгушин И.И., Мезенцева Е.А. Нейтрофильные гранулоциты: участие в гомеостатических и репаративных процессах. Часть I // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 4. С. 609–624. doi: 10.15789/2220-7619-NGP-1257

**Citation:**

Dolgushin I.I., Mezentseva E.A. Neutrophil granulocytes: participation in homeostatic and reparative processes. Part I // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 4, pp. 609–624. doi: 10.15789/2220-7619-NGP-1257

## NEUTROPHIL GRANULOCYTES: PARTICIPATION IN HOMEOSTATIC AND REPARATIVE PROCESSES. PART I

Dolgushin I.I., Mezentseva E.A.

*South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation*

**Abstract.** After exiting from the bone marrow (BM) into the circulation, mature neutrophil granulocytes undergo a set of sequential phenotypic and physiological changes collectively called “aging” in the absence of inflammation, by constitutively sensing prime signals from commensal microbiota and acquiring higher functional alertness in case of activation upon tissue damage or pathogen invasion. Physiological aging of blood neutrophils and their subsequent return to the BM result in signals modulating size and function of the hematopoietic niche. Circadian physiological infiltration of BM by neutrophils contributes to maintaining baseline level of circulating hematopoietic progenitor cells capable of regeneration and immune surveillance. Apart from the BM, neutrophils actively enter other healthy tissues, probably exerting some effects on their baseline physiologic state. Using lung tissue, it has been shown that neutrophils can “govern” action of gene set regulating cell growth, migration, proliferation, differentiation, and carcinogenesis. Neutrophils participate in destruction of endometrial tissues during desquamation phase as well as subsequent repair and physiological angiogenesis during proliferative phase of the menstrual cycle; promote wall rupture of the preovulatory ovarian follicle and oocyte exit; contribute to degradation and resorption of the corpus luteum in pregnancy failure; play an important physiological role in vascular remodeling in pregnant uterus and developing maternal immune tolerance to semi-allogeneic fetus. Neutrophils actively migrating to the surface of intestinal epithelium during local infection and/or damage stimulate epithelial restitution and recovery of its barrier function. On the other hand, neutrophils recruited into the oral cavity regulate quantitative and qualitative composition of microbial communities in oral biofilms, and ensure healthy state of periodontal structures. Being a major player and regulator in healing of skin wounds at early stage, inflammation, neutrophils not only destroy potential pathogens, but also participate in cleansing wounds from cell debris, produce cytokines, enzymes, and growth factors affecting further stages in repair process. Both apoptosis and NETosis underlying neutrophil death greatly contribute to wound healing. However, dysregulation and imbalance in both apoptosis and NETosis may lead to unfavorable consequences as well as developing chronic non-healing wounds.

**Key words:** *neutrophilic granulocytes, life cycle, homeostasis, repair, skin, lungs, oral cavity, intestines, female reproductive tract.*

Начиная с XIX века нейтрофильные гранулоциты рассматривались и изучались прежде всего в контексте борьбы с инфекцией и инициации острого воспаления. При этом нейтрофилы классически считались однородной популяцией терминально дифференцированных короткоживущих клеток с ограниченным набором высококонсервативных функций. Однако исследования конца XX — начала XXI в. заметно расширили наше понимание биологии этих лейкоцитов. Пересмотрена модель их жизненного цикла [85]. На сегодняшний день не вызывает сомнений, что нейтрофилы являются гетерогенной совокупностью пластичных клеток с разнообразными функциями и фенотипическими характеристиками [3, 4, 5, 25, 43, 45, 52, 63, 64, 85, 89, 95, 98, 103, 109, 115].

Интересные статистические данные приведены группой бразильских ученых в обзорной статье 2015 г., посвященной нейтрофилам [89]. По данным авторов, за 10 лет (с 2004 по 2014 г.) опубликовано 8003 статьи, трактующие деятельность нейтрофилов как «плохих парней» с провоспалительной и повреждающей активностью, участвующих в патогенезе аутоиммунных и опухолевых заболеваний, и только 3060 статей, описывающих нейтрофилы как

«хороших парней», способствующих защите постоянства внутренней среды организма и резолюции воспаления (поиск статей осуществлялся в базе данных Medline PubMed) [89]. При этом поиск по ключевым словам «гомеостаз и нейтрофилы» за период с 2004 по 2014 г. обнаружил на 60% больше опубликованных статей, чем до 2003 г., что свидетельствует о лучшем понимании физиологической, регулирующей роли нейтрофилов, появившемся в последние годы [89].

В нашей предыдущей статье мы фокусировали внимание на результатах исследований последних лет, демонстрирующих регуляторное влияние нейтрофилов по отношению к другим клеткам иммунной системы и развитию иммунного ответа [2]. Целью настоящего обзора является рассмотрение современных данных, свидетельствующих в первую очередь о гомеостатической роли нейтрофильных гранулоцитов. Не преуменьшая возможности реализации гистопатологического потенциала нейтрофилов при различных заболеваниях, мы все же хотим сделать акцент на оценке их деятельности как «хороших парней», участвующих в поддержании физиологического состояния различных тканей и органов. В последнее время появляется все больше данных о том,

что нейтрофилы обеспечивают важные сигналы, способствующие разрешению воспаления, регенерации эпителия и восстановлению мукозального гомеостаза. При этом основными компонентами последнего являются клетки эпителия, покрытые слоем слизи, и комменсальная микробиота, участвующая в формировании колонизационной резистентности. Вызывают интерес механизмы взаимодействия нейтрофилов с представителями нормальной микрофлоры, эпителиоцитами слизистых оболочек и кожи, и то, каким образом нейтрофилы участвуют в поддержании мукозального гомеостаза и эпителиального барьера.

### Модель жизненного цикла и старение нейтрофилов

Нейтрофилы составляют около 70% всех лейкоцитов человека, и около  $10^{11}$  этих клеток производится каждый день в костном мозге (КМ) человека в условиях нормы [14, 95, 106]. Удержание зрелых нейтрофилов в КМ и их высвобождение в циркуляцию регулируется двумя мембранными хемокиновыми рецепторами: CXCR4 и CXCR2 соответственно [34, 87, 95]. Остеобласты и другие клетки стромы КМ продуцируют фактор стромальных клеток 1 (stromal-derived factor-1 — SDF-1), или хемокин CXCL12, взаимодействие которого с CXCR4-экспрессирующими нейтрофилами способствует их сохранению в КМ [27, 48, 95, 106, 114]. Мобилизации нейтрофилов в кровоток способствует, с одной стороны, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (granulocyte colony-stimulating factor — G-CSF) путем уменьшения экспрессии CXCL12 стромальными клетками КМ и снижения экспрессии CXCR4 на самих нейтрофилах; с другой стороны, экспрессия эндотелиальными клетками вне костного мозга лигандов для CXCR2: CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL8 [33, 59, 95].

Принято считать, что срок жизни нейтрофилов в циркуляции составляет менее суток и может колебаться у здорового человека от 4 до 18 ч [18, 66, 87, 108, 114], а у мышей — в среднем 12 ч [24, 87]. Однако в 2010 г. группа голландских ученых опубликовала данные своих исследований, согласно которым продолжительность жизни нейтрофилов человека в крови в среднем может составлять 5,4 суток [90].

Судьба зрелых нейтрофилов в циркуляции может складываться по одному из двух сценариев. В случае развития воспаления, при инфекции или повреждении тканей, нейтрофилы мигрируют в очаг, где, выполнив свою работу,

подвергаются клиренсу в основном резидентными макрофагами и дендритными клетками в процессе фагоцитоза [20, 24, 95]. В отсутствие же воспаления, в условиях нормы, нейтрофилы по окончании срока жизни элиминируются преимущественно макрофагами селезенки, печени и КМ [24, 87]. При этом за время нахождения в сосудистом русле нейтрофилы претерпевают ряд изменений. Наблюдения за циркулирующими в крови нейтрофилами *in vivo* в течение суток показали, что у здоровых мышей примерно через 4–6 ч после выхода из КМ в кровоток нейтрофилы меняют свою морфологию и фенотип [24]. Этот фенотипический сдвиг с момента высвобождения нейтрофилов из КМ («свежие» нейтрофилы) до времени их ухода из кровообращения («старые» нейтрофилы) в отсутствие воспаления был назван «старением» [10, 103]. Нейтрофилы, недавно вышедшие из КМ, являются CD62L<sup>hi</sup>CXCR4<sup>low</sup> [24, 95]. По мере увеличения времени нахождения в циркуляции стареющие нейтрофилы демонстрируют снижение уровня экспрессии L-селектина (CD62L) и увеличение экспрессии CXCR4, приобретая фенотип CD62L<sup>low</sup>CXCR4<sup>hi</sup> [24, 95]. Реэкспрессия CXCR4, как полагают, побуждает стареющие нейтрофилы к возвращению, хоумингу, в КМ, где они подвергаются апоптозу и фагоцитируются стромальными макрофагами [14].

Анализ поверхностных антигенов показал, что у стареющих нейтрофилов в условиях нормы также наблюдаются значительно более высокие уровни экспрессии TLR4 и молекул, участвующих в межклеточных взаимодействиях, миграции и экстравазации клеток, включая интегрины LFA-1/CD11a, Mac-1/CD11b, VLA-4/CD49d и ICAM-1 [24, 95, 113, 125]. Это, с одной стороны, свидетельствует о том, что стареющие нейтрофилы демонстрируют повышенную готовность в любой момент выйти в ткани и реализовать там свои функции; с другой стороны, показывает, что нейтрофилы конститутивно получают праймирующие сигналы и становятся более активными по мере старения в кровообращении [125]. Источниками праймирующих сигналов для стареющих нейтрофилов, как было установлено, являются в первую очередь молекулярные структуры комменсальной микробиоты, реализующие свое действие через TLR- и Myd88-опосредованные сигнальные пути [125]. У мышей, пролеченных антибиотиками широкого спектра действия, были значительно уменьшены и процент, и абсолютное число стареющих нейтрофилов [125]. При этом их число восстанавливалось, когда животным вводили

внутрижелудочным зондом липополисахарид (ЛПС), лиганд TLR4, или пептидогликан, лиганд TLR2 [125]. Также количество общих и стареющих нейтрофилов было значительно снижено у стерильных (*germ-free*) мышей и частично восстанавливалось после фекальной трансплантации [125]. Вместе с изменениями поверхностной экспрессии ряда молекул в нейтрофилах при старении происходят и морфологические трансформации: уменьшение размеров клетки и количества гранул, гиперсегментация ядра [24, 95, 103].

При оценке эффекторного потенциала стареющих нейтрофилов *in vitro* было установлено, что их способность генерировать активные формы кислорода (*reactive oxygen species* — ROS) не отличается от таковой у нестарых нейтрофилов [113]. Также при стимуляции ЛПС не выявлено достоверных различий в продукции провоспалительных (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) и противовоспалительных (IL-4, IL-10, IFN $\alpha$ ) цитокинов у стареющих и у недавно вышедших из костного мозга нейтрофилов [113]. Однако под влиянием воспалительных стимулов, включая ЛПС, липотейхоевые кислоты, белок HMGB-1 (мощный медиатор стерильной травмы), у стареющих нейтрофилов, в отличие от нестарых, повышается уровень поверхностной экспрессии  $\beta_2$ -интегринов Mac-1/CD11b с высокоаффинной конформацией [113]. Кроме того, при активации у стареющих нейтрофилов выявляется значительно более высокий фагоцитарный потенциал [113], а также повышенная способность к высвобождению внеклеточных ловушек (*neutrophil extracellular traps* — NETs) [125], чем у нестарых нейтрофилов. Интересно, что истощение кишечной микробиоты антибиотиками широкого спектра действия приводит к функциональным изменениям стареющих нейтрофилов, что проявляется в значительном снижении их адгезии и активации Mac-1, способности образовывать NETs [87, 125].

Таким образом, старение нейтрофилов в циркуляции и параллельное праймирование продуктами микробиоты делает их более «отзывчивыми» и в случае необходимости позволяет этим более «профессионально подкованным» клеткам быстро перейти в очаг инфекции или повреждения и осуществить там свои эффекторные функции, возможно, с более высоким «коэффициентом полезного действия» [87, 113, 125].

Интересные данные о суточных изменениях нейтрофилов периферической крови человека были недавно получены группой венгерских ученых [36, 37]. Показано, что в течение дня

у человека меняется пропорциональное соотношение стареющих и свежих нейтрофилов в циркуляции. В утренние часы, с максимумом в 7:50, доминируют свежие нейтрофилы, обладающие большей гранулярностью. В вечернее время, между 20:00 и 24:00 часами с максимумом примерно в 23:36, достигает пика общее количество нейтрофилов в циркуляции с превалированием доли состарившихся нейтрофилов, характеризующихся изменением сегментации ядра, увеличением экспрессии CXCR4. При этом параллельно с пиком экспрессии CXCR4 наблюдается повышение в плазме крови уровня CXCL12, секретируемого стромальными клетками КМ, что способствует хоумингу старых нейтрофилов и постепенному снижению общего количества нейтрофилов поздней ночью. В ранние утренние часы секреция CXCL12 редуцируется, что способствует выходу в кровотоки свежих нейтрофилов. Параллельно со старением нейтрофилов аналогичные суточные колебания с максимумом в ночное время демонстрируют уровни экспрессии Grp91phox, основного компонента NADPH-оксидазы нейтрофилов, необходимого для продукции супероксидного радикала. При этом нейтрофилы, выделенные в 1 час ночи, фагоцитируют значительно больше опсонизированных бактерий *S. aureus* и продуцируют значительно больше супероксида, чем клетки, выделенные в 1 час дня, что отражает более мощный защитный потенциал стареющих нейтрофилов человека [36, 37].

Абсолютное количество нейтрофилов в крови у мышей также подвержено циркадным колебаниям [24]. При проведении исследований мышей содержат в условиях свет-темнового режима: 12 часов свет/12 часов темнота, при этом ZT0 — включение света, ZT12 — выключение света, то есть между ZT0 и ZT12 — светлая фаза суток, соответствующая периоду покоя животных, а между ZT12 и ZT0 — темная фаза суток, характеризующаяся активностью животных. Период активного выхода нейтрофилов из костного мозга и, соответственно, увеличения их числа в циркуляции наблюдается между ZT17 и ZT5, а время клиренса и, соответственно, падения количества в крови — между ZT5 и ZT13 [24]. При этом число стареющих нейтрофилов CD62L<sup>low</sup>CXCR4<sup>hi</sup> в кровообращении демонстрирует аналогичную суточную динамику с акрофазой (то есть максимальным значением) в ZT5 и последующим постепенным снижением, а значит, элиминацией, в период между ZT5 и ZT17 [24]. Возвращение в КМ физиологически стареющих CD62L<sup>low</sup>CXCR4<sup>hi</sup> нейтрофилов в конце

периода покоя животных и их уничтожение костномозговыми макрофагами генерирует сигналы, модулирующие размер и функции гемопоэтической ниши [24]. Гемопоэтическая ниша — это многокомпонентное сообщество, в которое входят стромальные клетки, необходимые для поддержания костномозгового гемопоэза, удержания и мобилизации гемопоэтических клеток-предшественников (ГКП) [24, 77, 85]. Циркадная физиологическая инфильтрация КМ нейтрофилами оказывает тормозящее влияние на количество и активность стромальных клеток, что содействует ритмичному выходу ГКП в кровотоки [24, 85]. Полученные результаты раскрывают процесс, синхронизирующий иммунные и кроветворные ритмы [24]. Отвечая на вопрос, каковым же может быть физиологическое значение модуляции гемопоэтической ниши за счет клиренса нейтрофилов, авторы дают следующее объяснение. Нейтрофилы обладают выраженной способностью к миграции и чрезвычайно чувствительны к изменениям среды, например к травме или инфекции. При этом реакция на повреждение продлевает срок их жизни и приводит к потере тропизма к КМ. Таким образом, циркулирующие нейтрофилы могут функционировать как своеобразные «датчики» состояния организма: нормальная миграция состарившихся и готовых к смерти нейтрофилов в КМ показывает, что «ничего тревожного» в организме не произошло. Даже в этих условиях, при отсутствии травмы или инфекции, потребность поддерживать базовый уровень внекостномозговых ГКП, обладающих функциями регенерации или иммунного наблюдения, может быть удовлетворена за счет нейтрофил-клиренс-индуцированной мобилизации их из КМ [24].

Интересные данные о роли нейтрофилов в тканях в стационарных (steady-state) условиях, то есть в отсутствие воспалительных стимулов, были опубликованы международной группой ученых в 2018 г. [23]. При исследовании здоровых мышей, содержащихся в условиях, свободных от специфических патогенов (specific pathogen-free), авторы установили, что LубG-нейтрофилы обнаруживаются в большинстве анализируемых тканей: в КМ, селезенке, легких, печени, кишечнике, белой жировой ткани (БЖТ), коже, скелетных мышцах, периферических лимфатических узлах, почках и сердце. При этом не удалось найти нейтрофилы только в яичниках, яичках и мозге, что согласуется с иммунопривилегированным статусом этих органов [23]. Авторы отметили, что в то время как трафик нейтрофилов

в здоровые ткани имел регулярный характер, степень нейтрофильной инфильтрации БЖТ, мышц и кишечника была на несколько порядков ниже, чем таких органов, как КМ, селезенка и легкие. Использование многофотонной микроскопии и микроскопии плоскостного освещения (light-sheet microscopy) позволило установить, что в большинстве органов распределение нейтрофилов было, по-видимому, случайным. Только в толстой кишке и в селезенке были обнаружены области предпочтительной концентрации нейтрофилов. В селезенке нейтрофилы преимущественно локализовались в краевой (маргинальной) зоне и красной пульпе. В слизистой оболочке кишечника нейтрофилы распределялись не равномерно, а группировались в отдельных участках, обогащенных В-лимфоцитами, которые напоминали изолированные лимфоидные фолликулы, и локализовались на периферии этих фолликулов, проксимальнее макрофагов [23]. Дополнительный анализ изображений показал, что в КМ, селезенке и кишечнике нейтрофилы преимущественно располагались в паренхиме ткани, то есть вне кровеносных сосудов, а в печени и легких, то есть в сильно васкуляризованных тканях, — преимущественно в сосудах [23].

Инфильтрация нейтрофилами большинства тканей имела суточные колебания, увеличиваясь в период активности животных, за исключением кишечника, печени и БЖТ, в которых число нейтрофилов не показывало ритмических осцилляций. Полученные данные свидетельствуют о том, что нейтрофилы активно проникают в здоровые ткани в количестве и с динамикой, специфичной для каждой ткани [23].

Исследуя потенциальные функции нейтрофилов в условиях здоровья, авторы установили, что нейтрофильная инфильтрация тканей регулирует гемопоэтическую активность КМ [23]. При этом ключевым сайтом, играющим наиболее значимую роль в этом процессе, авторы определили толстый кишечник, предполагив, что именно его тканевые макрофаги могут быть активными посредниками КМ-регулирующего действия нейтрофилов [23]. Механизм, лежащий в основе данного посреднического участия макрофагов, установлен в более ранних работах [105, 114]. В норме нейтрофилы, мигрирующие в периферические ткани, после того как подвергаются апоптозу, фагоцитируются тканевыми макрофагами, что вызывает у последних подавление секреции IL-23 и, как следствие, снижает продукцию IL-17 и G-CSF, что в итоге сдерживает

гранулопоз в костном мозге [105, 114]. Однако авторы определили, что нейтрофилы, инфильтрируя разные ткани, оказывают различное макрофаг-опосредованное влияние на ниши КМ: проникая во внекостномозговые ткани, они регулируют общую активность КМ, а значит, абсолютное количество циркулирующих ГКП, тогда как, попав в сам КМ, они влияют на суточный ритм миграции ГКП [23], что соотносится с ранее полученными данными [24] и о чем говорилось выше.

Установив, что вслед за КМ и селезенкой наиболее «заселенным» нейтрофилами органом здоровых животных являются легкие и что их нейтрофильная инфильтрация характеризуется циркадными ритмами, авторы провели транскриптомный анализ легочных тканей в разное время суток (утром ZT4 и вечером ZT16) у животных двух групп: контрольных мышей и мышей, которым предварительно вводили анти-Ly6G-антитела для истощения нейтрофилов [23]. Эксперимент по истощению нейтрофилов показал, что среди всех генов, проявляющих циркадную экспрессию в легких, значимая часть (26,7%) находилась «под управлением» нейтрофилов. В данную когорту входили гены, регулирующие клеточный рост, миграцию, пролиферацию, дифференцировку клеток, канцерогенез [23]. В настоящее время точно неизвестны механизмы, посредством которых нейтрофилы влияют на циркадную экспрессию генов в легких. Возможно, они могут изменять клеточный состав ткани, облегчая инфильтрацию других клеток, или высвобождать растворимые медиаторы, модулирующие транскрипцию в легочных клетках [23].

Делая итоговые выводы, авторы отметили, что, несмотря на то, что динамика, значение и судьба нейтрофилов в здоровых тканях остаются во многом неизученными, нейтрофилы могут выполнять важные гомеостатические функции после своей жизни в кровообращении, и нейтрофильная инфильтрация оказывает влияние на базальную физиологию тканей [23]. Нейтрофилы являются глобальными регуляторами гемопозитических ниш, действуя как локально в КМ, так и удаленно через инфильтрацию периферических тканей [23]. Полученные результаты демонстрируют первый пример транскрипционного программирования ткани инфильтрирующими ее нейтрофилами и имеют важные последствия для понимания влияния миелоидных клеток на неиммунную физиологию [23]. Циркадная динамика нейтрофильной инфильтрации различных тканей, возможно, может отражать способность нейтрофилов влиять на суточную

синхронизацию множества физиологических процессов в разных тканях, что требует дальнейшего изучения [23].

## Нейтрофилы легких

Пример органа, «населенного» нейтрофилами, — это легкое. В отличие от большинства тканей в легких большое количество нейтрофилов обнаружено в стационарном, то есть в отсутствие воспаления, состоянии у мышей и нечеловекообразных приматов [23, 29, 85]. Легкое имеет уникальную структуру, состоящую из трех функционально различных компартментов: альвеолярного, интерстициального и сосудистого [88]. Хотя у мышей в стационарном состоянии в легком был обнаружен пул тканевых экстравазкулярных резидентных нейтрофилов [62, 123], большинство легочных нейтрофилов входят в клеточный состав сосудистого компартмента [12, 23, 88, 123].

С помощью интравитальной микроскопии было установлено, что у мышей в здоровом легком нейтрофилы локализируются преимущественно в капиллярах (в сосудах с диаметром менее 10 мкм) и демонстрируют три поведенческих фенотипа: подвергшиеся непрочному прикреплению (*tethering*), ползающие (*crawling*) на короткие расстояния вдоль сосудистой стенки и прочно адгезированные (*firm adhesion*) [123].

У человека средний диаметр легочного капиллярного сегмента ~7,5 мкм, что меньше среднего диаметра нейтрофила, составляющего ~8 мкм [69]. Поэтому нейтрофилы должны деформироваться, чтобы пройти через легочную капиллярную сеть [69]. Изучение фиксированной легочной ткани человека с использованием сканирующей электронной микроскопии [32], а также исследования *in vivo* легких собак с помощью видеомикроскопии [46] и мышей с помощью интравитальной микроскопии с высоким разрешением [15, 72] выявили, что нейтрофилы, которые имеют сферическую форму в легочных артериолах, становятся эллипсоидными внутри капилляров легких [69]. Подобная морфологическая деформация не происходит мгновенно, поэтому нейтрофилы на некоторое время останавливаются у входа в капилляр [31, 32, 69]. Время остановки и последующего прохождения нейтрофила по легочной капиллярной сети зависит от давления, которое определяется отношением диаметра капилляра к диаметру нейтрофила и кортикальным натяжением (напряжением) нейтрофила, обусловленного наличием слоя актинового цитоскелета, известного как

«кора», под плазматической мембраной [39, 40, 69]. При этом более жесткие клетки тратят больше времени, чтобы войти в капиллярный сегмент [44, 69]. Некоторые капилляры в легком могут временно закупориваться за счет медленного прохождения нейтрофилов, что может занять более 5 минут [53, 69]. Однако взаимосвязанная архитектура легочной капиллярной сети обеспечивает достаточное количество альтернативных путей транзита эритроцитов вокруг тех капиллярных сегментов, которые временно «перекрыты» нейтрофилами [31, 69]. Паузы, которые делают нейтрофилы при входе в капилляры легких, приводят к увеличению времени транзита нейтрофилов и к, по меньшей мере, 50-кратно более высокой концентрации этих клеток в легочной циркуляции, чем в системной, с формированием так называемого маргинального пула [1, 31, 32, 69, 96] наряду с печенью и селезенкой [25]. Удержанию нейтрофилов в легких способствует не только их пассивное «застывание» в капиллярах [85]. Легочные нейтрофилы демонстрируют относительно высокую экспрессию хемокинового рецептора CXCR4, который облегчает их маргинацию путем связывания с лигандом CXCL12 (SDF-1), экспрессируемым легочным капиллярным эндотелием [29, 69, 85]. Интересно, что стареющие нейтрофилы, как было показано выше, экспрессируют больше CXCR4, поэтому, возможно, именно они преимущественно мигрируют в легкие [10, 95].

Нейтрофилы, присутствующие в легочном сосудистом пространстве, могут быть высвобождены в системную циркуляцию после лечения антагонистами CXCR4 или адреналином [29, 85] или могут инфильтрировать интерстиций и выходить в альвеолярные воздушные пространства во время воспаления и инфекции легких [62, 85].

На модели сепсиса у мышей, вызванного *E. coli*, было установлено, что более 50% бактерий секвестрируются в сосудистой сети легких, адгезируясь к стенке сосудов, в течение нескольких минут [123]. При этом ни у людей, ни у мышей в легких, в отличие от печени или селезенки, нет резидентных внутрисосудистых макрофагов, которые бы могли осуществить защиту от этих патогенов [123]. Данную функцию выполняют внутрисосудистые CD11b<sup>+</sup> нейтрофилы легких, которые демонстрируют значительное усиление «ползания» (crawling) и фагоцитируют приносимых кровью бактерий [123].

В 2017 г. международной группой ученых были опубликованы интересные данные о гомеостатической функции нейтрофилов [116].

Было показано, что нейтрофилы играют важную роль в восстановлении ткани после стерильной термической травмы печени у мышей, осуществляя «демонтаж» поврежденных микрососудов и «прокладывая путь» для образования новых [116]. Выполнив свою задачу, нейтрофилы не погибают в очаге стерильного воспаления, а возвращаются обратно в циркуляцию и мигрируют в легкие, прочно адгезируясь к эндотелию их микрососудов [25, 116]. В легочных сосудах происходит деактивация или перепрограммирование этих нейтрофилов с повышением экспрессии CXCR4 и последующим хоумингом в КМ, где они подвергаются апоптозу [25, 116]. В более ранних исследованиях британскими учеными было установлено, что в легочной сосудистой сети здорового человека обратимо задерживаются преимущественно праймированные нейтрофилы, которые подвергаются депраймированию и только после этого возвращаются в системную циркуляцию [107]. В итоге сосуды легких здорового человека защищают организм от возможного проявления гистотоксического потенциала праймированных и активированных нейтрофилов [107].

Таким образом, нейтрофилы в легких, как представляется, являются «стратегическим запасом», чтобы либо при необходимости снабжать кровообращение, либо реагировать на повреждение, легочную или генерализованную инфекцию [85, 123]. Кроме того, возможно, что для «отработавших» в других локализациях нейтрофилов легкие — это «перевалочный пункт», где происходит деактивация и подготовка к смерти.

## Нейтрофилы кожи

Кожа является самым крупным органом в организме человека и служит барьером, защищающим внутреннюю среду от физических и химических воздействий, проникновения микроорганизмов и чрезмерной потери воды [75]. При этом она играет роль не только механической преграды, но и содержит широкий спектр молекулярных и клеточных факторов, формирующих иммунную систему кожи [9, 19, 75]. Последняя включает в себя два компартмента: эпидермальный и дермальный [8, 84]. В неповрежденной коже нейтрофилы встречаются в небольшом количестве в дермальном компартменте. Однако при травматизации и возникновении кожных ран нейтрофилы вносят существенный вклад в процесс репарации и восстановления целостности кожного покрова [61].

В норме процесс заживления начинается с момента повреждения тканей [121]. При этом заживление кожных ран у человека — это многостадийный процесс, включающий следующие этапы: гемостаз (первые минуты — часы), воспаление (1–3 сутки), пролиферация (4–21 сутки) и ремоделирование (21–365 сутки) [38, 68, 93]. Воспалительная фаза является ключевой как при физиологическом, так и при патологическом течении процесса заживления и характеризуется быстрым притоком нейтрофилов с последующей иммиграцией моноцитов, дифференцирующихся в макрофаги [13]. После травмы нейтрофилы первыми рекрутируются в сайт повреждения, привлекаемые провоспалительными цитокинами и хемокинами (TNF $\alpha$ , IL-8), ростовыми факторами (PDGF, TGF- $\beta$ 1), метаболитами арахидоновой кислоты (лейкотриены, простагландины), анафилотоксинами (C3a, C5a), связанными с повреждением молекулярными паттернами (DAMPs), и становятся доминирующей популяцией клеточного содержимого раны в первые 24–48 часов. Их роль заключается в уничтожении возможных патогенов, а также в очищении раны от клеточного дебриса и эритроцитов за счет генерации свободных радикалов, NETs и секреции протеаз [38, 61, 91, 93, 115, 118, 126, 128]. При этом установлено, что нейтрофилы, прибывающие в очаг повреждения, кроме многочисленных антимикробных субстанций, способны генерировать цитокины и ростовые факторы, влияющие на дальнейшие этапы процесса заживления [60]. У мигрировавших в рану нейтрофилов по сравнению с циркулирующими клетками происходит изменение экспрессии ряда генов нескольких функциональных категорий. Во-первых, усиливается транскрипция антиапоптотических генов в сочетании с угнетением активности проапоптотических. Во-вторых, меняется уровень транскрипции генов ряда сигнальных молекул и их рецепторов. Так, активируется экспрессия генов, отвечающих за синтез хемокинов и цитокинов, привлекающих в очаг и активирующих макрофаги, Т-лимфоциты, гранулоциты и модулирующих воспалительный ответ: MCP-1, MIP-1, IL-8, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ . Усиливается транскрипция факторов, способствующих ангиогенезу (VEGF, IL-8, GRO- $\gamma$ , MCP-1), пролиферации кератиноцитов и фибробластов (IL-8, IL-1 $\beta$ , MCP-1), адгезии кератиноцитов к дермальному слою (LAMB3), индукции экспрессии антимикробных пептидов в кератиноцитах (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ), ремоделированию ткани за счет разрушения фибриновых сгуст-

ков и деградации внеклеточного матрикса (uPA или PLAU) [16, 17, 38, 47, 76, 80, 93, 94, 104, 110]. Одновременно в раневых нейтрофилах подавляется экспрессия рецепторов IL-8R $\alpha$ , IL8-R $\beta$ , G-CSFR и TLR 1 и TLR 6, которые опосредуют хемотаксис и клеточную активацию, что свидетельствует о снижении чувствительности к хемотаксическим и иммунорегуляторным медиаторам после того, как нейтрофилы мигрировали в пораженные участки кожи и были активированы [110].

Стадия пролиферации при заживлении ран начинается с ангиогенеза и фиброгенеза, способствующих формированию грануляционной ткани. При этом происходит процесс дифференцировки фибробластов в миофибробласты, обладающие высокой сократительной способностью, что помогает «затягиванию» раневого дефекта [49, 126]. Ведущим фактором, опосредующим активацию дифференцировки миофибробластов, является TGF- $\beta$  [79, 119, 126]. Доминирующей популяцией клеток, являющихся источником TGF- $\beta$  и способствующих ангиогенезу и фиброгенезу во время стадии пролиферации, традиционно считаются макрофаги. Однако группой американских ученых было установлено, что нейтрофилы, мигрирующие в область кожной раны уже в первые часы и подвергшиеся активации, также способны стимулировать ангиогенез и дифференцировку фибробластов в миофибробласты за счет выделения в процессе дегрануляции пируваткиназы M2 (PKM2), фермента, участвующего в последних этапах гликолиза и превращающего фосфоэнолпируват (ФЭП) в пируват, перенося одну фосфатную группу с ФЭП на АДФ и генерируя АТФ [126, 127]. Предварительное внутрибрюшинное введение моноклональных анти-PKM2-антител мышам за сутки до нанесения кожной раны приводило к замедлению скорости закрытия кожного дефекта. Последующее иммуногистохимическое исследование биоптатов тканей из ран с использованием анти-CD31-антител выявило, что нарушение заживления при введении анти-PKM2-антител связано с угнетением ангиогенеза, проявляющимся в значительном снижении плотности и длины капилляров [126, 127]. CD31, или PECAM-1, — член семейства молекул адгезии поверхностных гликопротеинов, вовлеченный в межклеточные взаимодействия, процессы эмбриогенеза и развития тканей; является маркером ангиогенеза, в том числе и при опухолевом росте [6]. В более ранних публикациях этой же группой исследователей было отмечено, что внеклеточная PKM2 способствует ангиогенезу злокачествен-

ственных опухолей [71]. При этом, как в случае ангиогенеза при заживлении ран, так и при опухолевом ангиогенезе, внеклеточная РКМ-2 взаимодействует с  $\alpha\upsilon\beta 3$  интегринами эндотелиальных клеток, усиливая их пролиферацию, миграцию и адгезию к внеклеточному матриксу [126]. Выделившаяся из активированных раневых нейтрофилов РКМ-2 способствует дифференцировке дермальных фибробластов человека в миофибробласты через активацию поверхностных  $\alpha\upsilon\beta 3$  интегринов TGF- $\beta$ -независимым путем [126]. Таким образом, авторы выявили важную связь между инфильтрацией/активацией нейтрофилов в раннюю воспалительную фазу и последующей стадией пролиферации в процессе заживления кожных ран [126, 127]. В моделях на мышах было показано, что нейтрофилы, мигрирующие в область раны, являются также источником карбоангидразы IV [11]. Данный фермент катализирует реакцию  $\text{CO}_2$  и воды с образованием бикарбонат-ионов  $\text{HCO}_3^-$  и протонов  $\text{H}^+$ , что ведет к закислению среды в раневом микроокружении. Снижение pH приводит, с одной стороны, к повышению выживаемости самих нейтрофилов; с другой стороны, способствует миграции кератиноцитов и эпителизации раны, начиная уже с первых часов после повреждения [11].

Важными факторами для физиологического процесса заживления ран являются ROS и оксигенация тканей. При этом установлено, что свободно радикальные окислители (например,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) являются не только деструктивными агентами, но в низких концентрациях могут выполнять функцию мессенджеров в передаче внутриклеточных сигналов и процессах, регулирующих экспрессию генов [92, 97, 99, 100, 101]. На стадии воспаления, в первые двое суток после повреждения, основными «поставщиками» ROS в ране являются нейтрофилы, а затем макрофаги, в которых активируется NADPH-оксидаза-зависимый механизм респираторного взрыва. Около 98%  $\text{O}_2$ , потребляемого нейтрофилами в месте повреждения, используется для респираторного взрыва [100]. И хотя продуцируемый фагоцитами на ранних стадиях пероксид водорода оказывает преимущественно антимикробное действие, как было показано на моделях мышей, он вносит свой вклад в индукцию экспрессии VEGF и, как следствие, обладает ангиогенным эффектом и способствует последующим стадиям заживления кожного дефекта [97]. Доказательством участия генерируемого NADPH-оксидазным комплексом нейтрофилов пероксида водорода в заживлении ран является нарушение про-

цессов регенерации у пациентов с хронической гранулематозной болезнью, первичным иммунодефицитным состоянием, связанным с мутациями в гене *p47phox*, необходимым для работы NADPH-оксидазы [35, 65, 97].

Важно, что нейтрофилы, являясь основным участником и регулятором заживления ран на ранней стадии, стадии воспаления, одновременно проявляют и противовоспалительные свойства, в том числе подавляя и собственную активность, способствуя переходу к следующим стадиям пролиферации и ремоделирования [38, 118]. Так, у раневых нейтрофилов усиливается мембранная экспрессия рецепторов к TGF- $\beta 1$  [110], который секретируется активированными макрофагами и обладает ингибирующим действием по отношению к нейтрофилам, стимулируя при этом дифференцировку миофибробластов. Можно предположить, что как только хемокины нейтрофилов привлекли достаточное количество макрофагов в очаг повреждения, последние начинают снижать активность нейтрофилов посредством влияния TGF- $\beta 1$  и, таким образом, на 2–4 сутки «захватывать лидирующие позиции» и инициировать следующий этап заживления ран [61, 110]. Кроме того, нейтрофилы, подвергшиеся апоптозу после выполнения своих функций в ране, фагоцитируются макрофагами, то есть подвергаются эффероцитозу. Данный процесс способствует трансформации макрофагов с провоспалительным фенотипом M-1 в противовоспалительные клетки M-2. M2-макрофаги продуцируют TGF- $\beta 1$ , IL-10, IL-1RA, что ведет к резолуции воспаления, а также стимулируют ангиогенез, пролиферацию миофибробластов, синтез компонентов внеклеточного матрикса и коллагена [38, 42, 61, 102, 115, 117, 121].

Интересные данные о механизмах резолуции воспаления были получены в модели острого зимозан-индуцированного перитонита у мышей [73]. При исследовании перитонеальной жидкости было установлено, что число нейтрофилов достигает максимума через 6 часов, а затем в течение 18 часов, то есть к концу первых суток, снижается на 50%, продолжая и дальше падать. Число же макрофагов увеличивается и достигает пика к 24 часам, сохраняясь на высоком уровне в течение 48 часов. В сроки, совпадавшие с максимумом нейтрофилов и макрофагов, то есть через 6 и 24 часа соответственно, в перитонеальной экссудате также выявлялись пиковые концентрации эритропоэтина (EPO), HIF-1 $\alpha$  и ROS. Кроме того, с помощью проточной цитофлуориметрии было установлено, что рецепторы к EPO

(EPOR) экспрессируются макрофагами, но не нейтрофилами. При этом у мышей с отсутствием EPOR на макрофагах (EPOR-дефицитных мышей) достоверно снижается уровень противовоспалительного цитокина TGF- $\beta$ , увеличиваются концентрации провоспалительных цитокинов (IL-6, TNF $\alpha$ , MCP-1, IFN $\gamma$ ) и повышается число апоптотных нейтрофилов в экссудате по сравнению с контрольными животными, экспрессирующими EPOR, в аналогичные временные интервалы, что приводит к пролонгации стадии воспаления. Из полученных данных авторами были сделаны следующие выводы. В период активного воспаления доминирующей популяцией клеток являются нейтрофилы, которые активно потребляют кислород, генерируя в большом количестве ROS и способствуя тем самым формированию локальной гипоксии, что ведет к активации NIF посредством стабилизации субъединицы NIF-1 $\alpha$ . В свою очередь NIF-1 $\alpha$  усиливает экспрессию генов, кодирующих синтез эритропоэтина, следствием чего является повышение концентрации последнего. EPO взаимодействует с EPOR на макрофагах, включая ряд сигнальных путей и стимулируя клиренс апоптотных нейтрофилов, результатом чего является своевременная резолуция воспаления [13, 73]. Поскольку в области кожных ран также развивается тканевая гипоксия [100], можно предположить, что механизм резолуции воспаления, предложенный в модели зимозан-индуцированного перитонита, срабатывает и в процессе заживления дефектов кожи.

Значимость нейтрофилов в процессе заживления ран подтверждается тем, что у пациентов с нейтропенией или с дефектами миграции и функционирования нейтрофилов, например, при хронической гранулематозной болезни, увеличивается риск инфицирования и ухудшается процесс регенерации [70, 83, 118]. Однако нельзя не отметить, что в последние годы появился ряд публикаций, отмечающих важную роль нейтрофилов в патогенезе хронических незаживающих/трудно заживающих ран [30, 38, 68, 76, 81, 118, 122]. К хроническим традиционно относят следующие категории ран: трофические язвы вследствие венозной недостаточности (венозные трофические язвы), пролежни, диабетические язвы, артериальные (ишемические) трофические язвы [82, 128]. Ключевым событием при формировании хронических ран является нарушение своевременного перехода стадии воспаления, основным участником которой являются нейтрофилы, в стадию пролиферации. Чрезмерная инфильтрация нейтрофилами и их гиперактивация

в ране приводит к выраженной продукции ROS, провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ), повышенной секреции матриксных металлопротеиназ (MMP-2, MMP-8, MMP-9), сериновых протеаз (катепсина G, эластазы, протеиназы 3) и к инаktivации протеазных ингибиторов ( $\alpha$ 1-антитрипсина). Последствиями этого являются повреждение мембран клеток, внеклеточного матрикса, деградация важных ростовых факторов PDGF-BB, TGF- $\beta$ 1, HGF и, как итог, нарушение дальнейших этапов заживления и формирование «замкнутого круга» воспаления [38, 67, 68, 76, 82, 91, 118, 128]. Одной из причин персистенции воспаления при хронических незаживающих ранах может быть дисрегуляция апоптоза нейтрофилов [68, 91]. Так, установлено, что в биоптатах кожных ран мышей и пациентов с диабетом наблюдается значительное повышение числа апоптотных каспаза-3-позитивных нейтрофилов [26, 58]. Это связано, с одной стороны, вызванным конечными продуктами гликирования усилением апоптоза нейтрофилов; с другой стороны, ослаблением фагоцитарной активности раневых макрофагов и, как следствие, нарушением эффероцитоза и клиренса апоптотных нейтрофилов [22, 58].

В 2016 г. были опубликованы результаты исследований итальянских ученых, которые впервые с помощью протеомного анализа установили, что в хронических незаживающих ранах пациентов с синдромом диабетической стопы (СДС) наблюдается значительное (более чем в 2 раза) увеличение концентрации ядерных (гистоны) и гранулярных (эластаза, протеиназа 3, желатиназа) компонентов NETs по сравнению с содержимым нормально заживающих ран [41]. Интересно, что у пациентов с длительно незаживающими раневыми дефектами стоп выявилось повышение количества компонентов NETs (олиго- и мононуклеосомы, эластаза, желатиназа, протеиназа 3) и в системной циркуляции, а нейтрофилы, выделенные из периферической крови, демонстрировали праймированность к спонтанному нетозу [41]. Этой же группой ученых в моделях на мышах со стрептозотоцин-индуцированным диабетом с помощью проточной цитофлуориметрии и конфокальной интравитальной микроскопии было обнаружено, что в кожных ранах в первые трое суток наблюдается значительное увеличение числа Gr-1<sup>+</sup> нейтрофилов по сравнению с интактной кожей и более 10% этих клеток подвергается нетозу. При этом в раневых экстрактах данных животных значительно повышается активность PAD4 — фермента, стимуляция которого за-

пускает нетоз, вызывая цитруллинацию гистонов и деконденсацию хроматина. При этом заживление ран у диабет-индуцированных животных протекает медленнее, чем у мышей без диабета, а применение ингибитора PAD4, хлор-амидина, приводит к нормализации процесса регенерации у больных животных [41].

Поскольку образование NETs является одним из механизмов борьбы с микроорганизмами, вызывая их иммобилизацию, уничтожение и препятствуя диссеминации инфекции [21, 28, 74, 124], усиление нетоза в хронических трудно заживающих ранах отчасти можно объяснить повышенным формированием полимикробных биопленок в таких ранах [55, 56, 120]. Биопленка — это трехмерная структура, образующаяся в результате агрегации микробов, заключенных в экзополимерный матрикс, состоящий из полисахаридов, липидов, нуклеиновых кислот и белков [50, 54, 56, 86, 111]. Одним из регуляторных механизмов, играющих значительную роль в координации формирования биопленки для многих видов микроорганизмов, является межклеточная передача сигналов, или quorum sensing (QS). Микробы секретируют широкий спектр низ-

комолекулярных сигнальных молекул (аутоиндукторов), которые вызывают или подавляют экспрессию QS-контролируемых генов через взаимодействие с рецепторными белками [7, 54, 86]. При этом некоторые малые QS-молекулы являются мощными хемоаттрактантами для нейтрофилов и вызывают их активацию, которая проявляется в виде дегрануляции и образования сетей [50, 51, 57, 78, 112].

Таким образом, и апоптоз, и нетоз, являясь механизмами гибели нейтрофилов, вносят огромный вклад в процесс заживления ран. Своевременный и адекватно регулируемый апоптоз нейтрофилов в зоне повреждения является одним из ключевых факторов завершения стадии воспаления, способствуя дальнейшему заживлению. Контролируемый нетоз важен для адекватной борьбы с микроорганизмами, которые весьма часто присутствуют в кожных ранах, что также способствует физиологическому течению процесса регенерации и восстановлению тканей. Однако дисрегуляция и нарушение баланса как апоптоза, так и нетоза могут приводить к негативным последствиям с формированием хронических длительно незаживающих ран.

## Список литературы/References

1. Долгушин И.И., Бухарин О.В. Нейтрофилы и гомеостаз. Екатеринбург: УрО РАН, 2001. 288 с. [Dolgushin I.I., Bukharin O.V. Neutrophils and homeostasis. *Ekaterinburg: The Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2001. 288 p. (In Russ.)*]
2. Долгушин И.И., Мезенцева Е.А., Савочкина А.Ю., Кузнецова Е.К. Нейтрофил как «многофункциональное устройство» иммунной системы // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 1. С. 9–38. [Dolgushin I.I., Mezentseva E.A., Savochkina A.Yu., Kuznetsova E.K. Neutrophil as a multifunctional relay in immune system. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity = 2019, vol. 9, no. 1, pp. 9–38. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-9-38 (In Russ.)*]
3. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А. Нейтрофильные гранулоциты: новый взгляд на «старых игроков» на иммунологическом поле // Иммунология. 2015. Т. 36, № 4. С. 257–265. [Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtadidze L.V., Kovaleva S.V., Evglevsky A.A. Neutrophilic granulocytes: a new look at “old players” on the immunological field. *Immunologiya = Immunology, 2015, vol. 36, no. 4, pp. 257–265. (In Russ.)*]
4. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А., Нгуен Т.З.Л. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. Часть 1 // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 3. С. 219–230. [Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtadidze L.V., Kovaleva S.V., Evglevsky A.A., Nguyen T.D.L. The new look at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas. Part 1. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2017, vol. 7, no. 3, pp. 219–230. doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-219-230 (In Russ.)*]
5. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А., Нгуен Т.З.Л. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. Часть 2 // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 1. С. 7–18. [Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtadidze L.V., Kovaleva S.V., Evglevsky A.A., Nguyen T.D.L. The new look at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas. Part 2. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2018, vol. 8, no. 1, pp. 7–18. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-7-18 (In Russ.)*]
6. Нефедова Н.А., Харлова О.А., Данилова Н.В., Мальков П.Г., Гайфуллин Н.М. Маркеры ангиогенеза при опухолевом росте // Архив патологии. 2016. Т. 78, № 2. С. 55–63. [Nefedova N.A., Kharlova O.A., Danilova N.V., Malkov P.G., Gaifullin N.M. Markers of angiogenesis in tumor growth. *Arkhiv patologii = Archive of Pathology, 2016, vol. 78, no. 2, pp. 55–63. doi: 10.17116/patol201678255-62 (In Russ.)*]
7. Хмель И.А., Белик А.С., Зайцева Ю.В., Данилова Н.Н. Quorum sensing и коммуникация бактерий // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. 2008. № 1. С. 28–35. [Khmel I.A., Belik A.S., Zaitseva U.V., Danilova N.N. Quorum sensing and communication in bacteria. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16: Biologiya = Moscow University Biological Sciences Bulletin, 2008, vol. 63, iss. 1, pp. 25–31. doi: 10.1007/s11966-008-1005-9 (In Russ.)*]
8. Цепколенко А.В. Иммунная система и регенеративный потенциал кожи // Дерматология та венерология. 2017. № 3 (77). С. 27–37. [Tsepkoenko G.V. Immune system and regenerative skin potential. *Dermatologiya ta venerologiya = Dermatology and Venereology, 2017, iss. 3 (77), pp. 27–37. (In Russ.)*]

9. Abdallah F., Mijouin L., Pichon C. Skin immune landscape: inside and outside the organism. *Mediators Inflamm.*, 2017, vol. 2017, Article ID 5095293, 17 pages. doi: 10.1155/2017/5095293
10. Adrover J.M., Nicolás-Ávila J.A., Hidalgo A. Aging: a temporal dimension for neutrophils. *Trends Immunol.*, 2016, vol. 37, iss. 5, pp. 334–345. doi: 10.1016/j.it.2016.03.005
11. Barker H., Aaltonen M., Pan P., Vähätupa M., Kaipainen P., May U., Prince S., Uusitalo-Järvinen H., Waheed A., Pastoreková S., Sly W.S., Parkkila S., Järvinen T.A. Role of carbonic anhydrases in skin wound healing. *Exp. Mol. Med.*, 2017, vol. 49, iss. 5: e334. doi: 10.1038/emm.2017.60
12. Barletta K.E., Cagnina R.E., Wallace K.L., Ramos S.I., Mehrad B., Linden J. Leukocyte compartments in the mouse lung: distinguishing between marginated, interstitial, and alveolar cells in response to injury. *J. Immunol. Methods*, 2012, vol. 375, iss. 1–2, pp. 100–110. doi: 10.1016/j.jim.2011.09.013
13. Bekeschus S., Lackmann J.W., Gümbel D., Napp M., Schmidt A., Wende K. A neutrophil proteomic signature in surgical trauma wounds. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, vol. 19, iss. 3: 761. doi: 10.3390/ijms19030761
14. Bekkering S., Torensma R. Another look at the life of a neutrophil. *World J. Hematol.*, 2013, vol. 2, iss. 2, pp. 44–58. doi: 10.5315/wjh.v2.i2.44
15. Bennowitz M.F., Watkins S.C., Sundt P. Quantitative intravital two-photon excitation microscopy reveals absence of pulmonary vaso-occlusion in unchallenged Sickle Cell Disease mice. *Intravital*, 2014, vol. 3, iss. 2: e29748. doi: 10.4161/intv.29748
16. Bernardini G., Ribatti D., Spinetti G., Morbidelli L., Ziche M., Santoni A., Capogrossi M.C., Napolitano M. Analysis of the role of chemokines in angiogenesis. *J. Immunol. Methods*, 2003, vol. 273, iss. 1–2, pp. 83–101. doi: 10.1016/S0022-1759(02)00420-9
17. Blasi F., Carmeliet P. uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2002, vol. 3, pp. 932–943. doi: 10.1038/nrm977
18. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, 2010, vol. 33, iss. 5, pp. 657–670. doi: 10.1016/j.immuni.2010.11.011
19. Bos J.D., Kapsenberg M.L. The skin immune system its cellular constituents and their interactions. *Immunol. Today*, 1986, vol. 7, iss. 7–8, pp. 235–240. doi: 10.1016/0167-5699(86)90111-8
20. Bratton D.L., Henson P.M. Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins. *Trends Immunol.*, 2011, vol. 32, iss. 8, pp. 350–357. doi: 10.1016/j.it.2011.04.009
21. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 2004, vol. 303, iss. 5663, pp. 1532–1535. doi: 10.1126/science.1092385
22. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 2001, vol. 414, iss. 6865, pp. 813–820. doi: 10.1038/414813a
23. Casanova-Acebes M., Nicolás-Ávila J.A., Li J.L., García-Silva S., Balachander A., Rubio-Ponce A., Weiss L.A., Adrover J.M., Burrows K., A-González N., Ballesteros I., Devi S., Quintana J.A., Crainiciuc G., Leiva M., Gunzer M., Weber C., Nagasawa T., Soehnlein O., Merad M., Mortha A., Ng L.G., Peinado H., Hidalgo A. Neutrophils instruct homeostatic and pathological states in naive tissue. *J. Exp. Med.*, 2018, vol. 215, no. 11, pp. 2778–2795. doi: 10.1084/jem.20181468
24. Casanova-Acebes M., Pitaval C., Weiss L.A., Nombela-Arrieta C., Chèvre R., A-González N., Kunisaki Y., Zhang D., van Rooijen N., Silberstein L.E., Weber C., Nagasawa T., Frenette P.S., Castrillo A., Hidalgo A. Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell*, 2013, vol. 153, iss. 5, pp. 1025–1035. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.040
25. Christoffersson G., Phillipson M. The neutrophil: one cell on many missions or many cells with different agendas? *Cell Tissue Res.*, 2018, vol. 371, iss. 3, pp. 415–423. doi: 10.1007/s00441-017-2780-z
26. Darby I.A., Bisucci T., Hewitson T.D., MacLellan D.G. Apoptosis is increased in a model of diabetes-impaired wound healing in genetically diabetic mice. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 1997, vol. 29, iss. 1, pp. 191–200. doi: 10.1016/S1357-2725(96)00131-8
27. De Filippo K., Rankin S.M. CXCR4, the master regulator of neutrophil trafficking in homeostasis and disease. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2018, vol. 48, iss. 52, special iss.: Neutrophils: e12949. doi: 10.1111/eci.12949
28. Delgado-Rizo V., Martínez-Guzmán M.A., Iñiguez-Gutierrez L., García-Orozco A., Alvarado-Navarro A., Fafutis-Morris M. Neutrophil extracellular traps and its implications in inflammation: an overview. *Front. Immunol.*, 2017, vol. 8: 81. doi: 10.3389/fimmu.2017.00081
29. Devi S., Wang Y., Chew W.K., Lima R., A-González N., Mattar C.N., Chong S.Z., Schlitzer A., Bakocevic N., Chew S., Keeble J.L., Goh C.C., Li J.L., Evrard M., Malleret B., Larbi A., Renia L., Haniffa M., Tan S.M., Chan J.K., Balabanian K., Nagasawa T., Bachelier F., Hidalgo A., Ginhoux F., Kubers P., Ng L.G. Neutrophil mobilization via plerixafor-mediated CXCR4 inhibition arises from lung demargination and blockade of neutrophil homing to the bone marrow. *J. Exp. Med.*, 2013, vol. 210, no. 11, pp. 2321–2336. doi: 10.1084/jem.20130056
30. Diegelmann R.F. Excessive neutrophils characterize chronic pressure ulcers. *Wound Repair Regen.*, 2003, vol. 11, iss. 6, pp. 490–495. doi: 10.1046/j.1524-475X.2003.11617.x
31. Doerschuk C.M. Mechanisms of leukocyte sequestration in inflamed lungs. *Microcirculation*, 2001, vol. 8, iss. 2, pp. 71–88. doi: 10.1111/j.1549-8719.2001.tb00159.x
32. Doerschuk C.M., Beyers N., Coxson H.O., Wiggs B., Hogg J.C. Comparison of neutrophil and capillary diameters and their relation to neutrophil sequestration in the lung. *J. Appl. Physiol.*, 1993, vol. 74, iss. 6, pp. 3040–3045. doi: 10.1152/jappl.1993.74.6.3040
33. Eash K.J., Means J.M., White D.W., Link D.C. CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions. *Blood*, 2009, vol. 113, iss. 19, pp. 4711–4719. doi: 10.1182/blood-2008-09-177287
34. Eash K.J., Greenbaum A.M., Gopalan P.K., Link D.C. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J. Clin. Invest.*, 2010, vol. 120, iss. 7, pp. 2423–2431. doi: 10.1172/JCI41649
35. Eckert J.W., Abramson S.L., Starke J., Brandt M.L. The surgical implications of chronic granulomatous disease. *Am. J. Surg.*, 1995, vol. 169, iss. 3, pp. 320–323. doi: 10.1016/S0002-9610(99)80167-6
36. Ella K., Csépanyi-Kömi R., Káldi K. Circadian regulation of human peripheral neutrophils. *Brain Behav. Immun.*, 2016, vol. 57, pp. 209–221. doi: 10.1016/j.bbi.2016.04.016

37. Ella K., Mócsai A., Káldi K. Circadian regulation of neutrophils: control by a cell-autonomous clock or systemic factors? *Eur. J. Clin. Invest.*, 2018, vol. 48, iss. 52, special iss.: *Neutrophils: e12965*. doi: 10.1111/eci.12965
38. Ellis S., Lin E.J., Tartar D. Immunology of wound healing. *Curr. Dermatol. Rep.*, 2018, vol. 7, iss. 4, pp. 350–358. doi: 10.1007/s13671-018-0234-9
39. Evans E., Kukan B. Passive material behavior of granulocytes based on large deformation and recovery after deformation tests. *Blood*, 1984, vol. 64, iss. 5, pp. 1028–1035.
40. Evans E., Yeung A. Apparent viscosity and cortical tension of blood granulocytes determined by micropipet aspiration. *Biophys. J.*, 1989, vol. 56, iss. 1, pp. 151–160. doi: 10.1016/S0006-3495(89)82660-8
41. Fadini G.P., Menegazzo L., Rigato M., Scattolini V., Poncina N., Bruttocao A., Ciciliot S., Mammano F., Ciubotaru C.D., Brocco E., Marescotti M.C., Cappellari R., Arrigoni G., Million R., Vigili de Kreutzenberg S., Albiero M., Avogaro A. NETosis delays diabetic wound healing in mice and humans. *Diabetes*, 2016, vol. 65, iss. 4, pp. 1061–1071. doi: 10.2337/db15-0863
42. Fadok V.A., Bratton D.L., Konowal A., Freed P.W., Westcott J.Y., Henson P.M. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J. Clin. Invest.*, 1998, vol. 101, iss. 4, pp. 890–898. doi: 10.1172/jci1112
43. Fraser J.A., Kemp S., Young L., Ross M., Prach M., Hutchison G.R., Malone E. Silver nanoparticles promote the emergence of heterogeneous human neutrophil sub-populations. *Sci. Rep.*, 2018, vol. 8: 7506. doi: 10.1038/s41598-018-25854-2
44. Gabriele S., Benoliel A.M., Bongrand P., Theodoly O. Microfluidic investigation reveals distinct roles for actin cytoskeleton and myosin II activity in capillary leukocyte trafficking. *Biophys. J.*, 2009, vol. 96, iss. 10, pp. 4308–4318. doi: 10.1016/j.bpj.2009.02.037
45. Garley M., Jabłońska E. Heterogeneity among neutrophils. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2018, vol. 66, iss. 1, pp. 21–30. doi: 10.1007/s00005-017-0476-4
46. Gebb S.A., Graham J.A., Hanger C.C., Godbey P.S., Capen R.L., Doerschuk C.M., Wagner W.W. Jr. Sites of leukocyte sequestration in the pulmonary microcirculation. *J. Appl. Physiol.*, 1995, vol. 79, iss. 2, pp. 493–497. doi: 10.1152/jappl.1995.79.2.493
47. Gillitzer R., Goebeler M. Chemokines in cutaneous wound healing. *J. Leukoc. Biol.*, 2001, vol. 69, iss. 4, pp. 513–521. doi: 10.1189/jlb.69.4.513
48. Hajishengallis E., Hajishengallis G. Neutrophil homeostasis and periodontal health in children and adults. *J. Dent. Res.*, 2014, vol. 93, iss. 3, pp. 231–237. doi: 10.1177/0022034513507956
49. Hinz B., Mastrangelo D., Iselin C.E., Chaponnier C., Gabbiani G. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *Am. J. Pathol.*, 2001, vol. 159, iss. 3, pp. 1009–1020. doi: 10.1016/S0002-9440(10)61776-2
50. Hirschfeld J. Dynamic interactions of neutrophils and biofilms. *J. Oral Microbiol.*, 2014, vol. 6: 26102. doi: 10.3402/jom.v6.26102
51. Holm A., Vikstrom E. Quorum sensing communication between bacteria and human cells: signals, targets, and functions. *Front. Plant Sci.*, 2014, vol. 5, article 309. doi: 10.3389/fpls.2014.00309
52. Hong C.W. Current understanding in neutrophil differentiation and heterogeneity. *Immune Netw.*, 2017, vol. 17, iss. 5, pp. 298–306. doi: 10.4110/in.2017.17.5.298
53. Huang Y., Doerschuk C.M., Kamm R.D. Computational modeling of RBC and neutrophil transit through the pulmonary capillaries. *J. Appl. Physiol.*, 2001, vol. 90, iss. 2, pp. 545–564. doi: 10.1152/jappl.2001.90.2.545
54. Irie Y., Parsek M.R. Quorum sensing and microbial biofilms. *Cur. Top. Microbiol. Immunol.*, 2008, vol. 322, pp. 67–84. doi: 10.1007/978-3-540-75418-3\_4
55. James G.A., Swogger E., Wolcott R., Pulcini Ed., Secor P., Sestrich J., Costerton J.W., Stewart P.S. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen.*, 2008, vol. 16, iss. 1, pp. 37–44. doi: 10.1111/j.1524-475X.2007.00321.x
56. Johnson T.R., Gómez B.I., McIntyre M.K., Dubick M.A., Christy R.J., Nicholson S.E., Burmeister D.M. The cutaneous microbiome and wounds: new molecular targets to promote wound healing. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, vol. 19, iss. 9: 2699. doi: 10.3390/ijms19092699
57. Karlsson T., Musse F., Magnusson K.E., Vikstrom E. N-acylhomoserine lactones are potent neutrophil chemoattractants that act via calcium mobilization and actin remodeling. *J. Leukoc. Biol.*, 2012, vol. 91, iss. 1, pp. 15–26. doi: 10.1189/jlb.0111034
58. Khanna S., Biswas S., Shang Y., Collard E., Azad A., Kauh C., Bhasker V., Gordillo G.M., Sen C.K., Roy S. Macrophage dysfunction impairs resolution of inflammation in the wounds of diabetic mice. *PLoS One*, 2010, vol. 5, iss. 3: e9539. doi: 10.1371/journal.pone.0009539
59. Köhler A., De Filippo K., Hasenberg M., van den Brandt C., Nye E., Hosking M.P., Lane T.E., Männ L., Ransohoff R.M., Hauser A.E., Winter O., Schraven B., Geiger H., Hogg N., Gunzer M. G-CSF-mediated thrombopoietin release triggers neutrophil motility and mobilization from bone marrow via induction of CXCR2 ligands. *Blood*, 2011, vol. 117, iss. 16, pp. 4349–4357. doi: 10.1182/blood-2010-09-308387
60. Kolaczowska E., Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2013, vol. 13, pp. 159–175. doi: 10.1038/nri3399
61. Kovtun A., Messerer D.A.C., Scharffetter-Kochanek K., Huber-Lang M., Ignatius A. Neutrophils in tissue trauma of the skin, bone, and lung: two sides of the same coin. *J. Immunol. Res.*, 2018, vol. 2018: 8173983. doi: 10.1155/2018/8173983
62. Kreisel D., Nava R.G., Li W., Zinselmeyer B.H., Wang B., Lai J., Pless R., Gelman A.E., Krupnick A.S., Miller M.J. In vivo two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil extravasation during pulmonary inflammation. *PNAS*, 2010, vol. 107, no. 42, pp. 18073–18078. doi: 10.1073/pnas.1008737107
63. Kruger P., Saffarzadeh M., Weber A.N., Rieber N., Radsak M., von Bernuth H., Benarafa C., Roos D., Skokowa J., Hartl D. Neutrophils: between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS Pathog.*, 2015, vol. 11, iss. 3: e1004651. doi: 10.1371/journal.ppat.1004651
64. Kubes P. The enigmatic neutrophil: what we do not know. *Cell Tissue Res.*, 2018, vol. 371, iss. 3, pp. 399–406. doi: 10.1053/j.gastro.2015.10.027
65. Kume A., Dinauer M.C. Gene therapy for chronic granulomatous disease. *J. Lab. Clin. Med.*, 2000, vol. 135, iss. 2, pp. 122–128. doi: 10.1067/mlc.2000.104458

66. Lahoz-Beneytez J., Elemans M., Zhang Y., Ahmed R., Salam A., Block M., Niederalt C., Asquith B., Macallan D. Human neutrophil kinetics: modeling of stable isotope labeling data supports short blood neutrophil half-lives. *Blood*, 2016, vol. 127, iss. 26, pp. 3431–3438. doi: 10.1182/blood-2016-03-700336
67. Landén N.X., Li D., Ståhle M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2016, vol. 73, iss. 20, pp. 3861–3885. doi: 10.1007/s00018-016-2268-0
68. Larouche J., Sheoran S., Maruyama K., Martino M.M. Immune regulation of skin wound healing: mechanisms and novel therapeutic targets. *Adv. Wound Care*, 2018, vol. 7, no. 7, pp. 209–231. doi: 10.1089/wound.2017.0761
69. Lee J.S., Donahoe M.P. Hematologic abnormalities and acute lung syndromes. *Springer International Publishing Switzerland*, 2017. 265 p. doi: 10.1007/978-3-319-41912-1
70. Lekstrom-Himes J.A., Gallin J.I. Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. *N. Engl. J. Med.*, 2000, vol. 343, iss. 23, pp. 1703–1714. doi: 10.1056/NEJM200012073432307
71. Li L., Zhang Y., Qiao J., Yang J.J., Liu Z.R. Pyruvate kinase M2 in blood circulation facilitates tumor growth by promoting angiogenesis. *J. Biol. Chem.*, 2014, vol. 289, no. 37, pp. 25812–25821. doi: 10.1074/jbc.M114.576934
72. Looney M.R., Thornton E.E., Sen D., Lamm W.J., Glenny R.W., Krummel M.F. Stabilized imaging of immune surveillance in the mouse lung. *Nat. Methods.*, 2011, vol. 8, iss. 1, pp. 91–96. doi: 10.1038/nmeth.1543
73. Luo B., Wang J., Liu Z., Shen Z., Shi R., Liu Y.Q., Liu Y., Jiang M., Wu Y., Zhang Z. Phagocyte respiratory burst activates macrophage erythropoietin signaling to promote acute inflammation resolution. *Nat. Commun.*, 2016, vol. 7: 12177. doi: 10.1038/ncomms12177
74. Manda A., Pruchniak M.P., Arażna M., Demkow U.A. Neutrophil extracellular traps in physiology and pathology. *Cent. Eur. J. Immunol.*, 2014, vol. 39, iss. 1, pp. 116–121. doi: 10.5114/cej.2014.42136
75. Mann E.R., Smith K.M., Bernardo D., Al-Hassi H.O., Knight S.C., Hart A.L. Review: Skin and the immune system. *J. Clin. Exp. Dermatol. Res.*, 2012, S2: 003. doi: 10.4172/2155-9554.S2-003
76. McDaniel J.C., Roy S., Wilgus T.A. Neutrophil activity in chronic venous leg ulcers — a target for therapy? *Wound Repair Regen.*, 2013, vol. 21, iss. 3, pp. 339–351. doi: 10.1111/wrr.12036
77. Mercier F.E., Ragu C., Scadden D.T. The bone marrow at the crossroads of blood and immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, vol. 12, iss. 1, pp. 49–60. doi: 10.1038/nri3132
78. Meyle E., Stroth P., Gunther F., Hoppy-Tichy T., Wagner C., Hänsch G.M. Destruction of bacterial biofilms by polymorphonuclear neutrophils: relative contribution of phagocytosis, DNA release, and degranulation. *Int. J. Artif. Organs.*, 2010, vol. 33, iss. 9, pp. 608–620. doi: 10.1177/039139881003300906
79. Midgley A.C., Rogers M., Hallett M.B., Clayton A., Bowen T., Phillips A.O., Steadman R. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1)-stimulated fibroblast to myofibroblast differentiation is mediated by hyaluronan (HA)-facilitated epidermal growth factor receptor (EGFR) and CD44 co-localization in lipid rafts. *J. Biol. Chem.*, 2013, vol. 288, no. 21, pp. 14824–14838. doi: 10.1074/jbc.M113.451336
80. Moir E., Booth N.A., Bennett B., Robbie L.A. Polymorphonuclear leucocytes mediate endogenous thrombus lysis via a u-PA-dependent mechanism. *Br. J. Haematol.*, 2001, vol. 113, iss. 1, pp. 72–80. doi: 10.1046/j.1365-2141.2001.02696.x
81. Moor A.N., Vachon D.J., Gould L.J. Proteolytic activity in wound fluids and tiss. derived from chronic venous leg ulcers. *Wound Repair Regen.*, 2009, vol. 17, iss. 6, pp. 832–839. doi: 10.1111/j.1524-475X.2009.00547.x
82. Mustoe T. Understanding chronic wounds: A unifying hypothesis on their pathogenesis and implications for therapy. *Am. J. Surg.*, 2004, vol. 187, iss. 5, suppl. 1, pp. S65–S70. doi: 10.1016/S0002-9610(03)00306-4
83. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.*, 2006, vol. 6, iss. 3, pp. 173–182. doi: 10.1038/nri1785
84. Nestle F.O., Di Meglio P., Qin J.Z., Nickoloff B.J. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 2009, vol. 9, iss. 10, pp. 679–691. doi: 10.1038/nri2622
85. Nicolás-Ávila J.Á., Adrover J.M., Hidalgo A. Neutrophils in homeostasis, immunity, and cancer. *Immunity*, 2017, vol. 46, iss. 1, pp. 15–28. doi: 10.1016/j.immuni.2016.12.012
86. Omar A., Wright J.B., Schultz G., Burrell R., Nadworny P. Microbial biofilms and chronic wounds. *Microorganisms*, 2017, vol. 5, iss. 1: 9, 15 pages. doi: 10.3390/microorganisms5010009
87. Ortmann W., Kolaczowska E. Age is the work of art? Impact of neutrophil and organism age on neutrophil extracellular trap formation. *Cell Tissue Res.*, 2018, vol. 371, iss. 3, pp. 473–488. doi: 10.1007/s00441-017-2751-4
88. Patel B.V., Tatham K.C., Wilson M.R., O’Dea K.P., Takata M. In vivo compartmental analysis of leukocytes in mouse lungs. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2015, vol. 309, iss. 7, pp. L639–L652. doi: 10.1152/ajplung.00140.2015
89. Perobelli S.M., Galvani R.G., Gonçalves-Silva T., Xavier C.R., Nóbrega A., Bonomo A. Plasticity of neutrophils reveals modulatory capacity. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2015, vol. 48, no. 8, pp. 665–675. doi: 10.1590/1414-431X20154524
90. Pillay J., den Braber I., Vrisekoop N., Kwast L.M., de Boer R.J., Borghans J.A., Tesselaar K., Koenderman L. In vivo labeling with <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*, 2010, vol. 116, iss. 4, pp. 625–627. doi: 10.1182/blood-2010-01-259028
91. Qing C. The molecular biology in wound healing & non-healing wound. *Chin. J. Traumatol.*, 2017, vol. 20, iss. 4, pp. 189–193. doi: 10.1016/j.cjtee.2017.06.001
92. Rhee S.G. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp. Mol. Med.*, 1999, vol. 31, pp. 53–59. doi: 10.1038/emmm.1999.9
93. Ridiandries A., Tan J.T.M., Bursill C.A. The role of chemokines in wound healing. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, vol. 19, iss. 10: 3217. doi: 10.3390/ijms19103217
94. Robbins P.B., Lin Q., Goodnough J.B., Tian H., Chen X., Khavari P.A. In vivo restoration of laminin 5 beta 3 expression and function in junctional epidermolysis bullosa. *PNAS*, 2001, vol. 98, iss. 9, pp. 5193–5198. doi: 10.1073/pnas.091484998
95. Rosales C. Neutrophil: a cell with many roles in inflammation or several cell types? *Front. Physiol.*, 2018, vol. 9: 113. doi: 10.3389/fphys.2018.00113

96. Rossaint J., Zarbock A. Tissue-specific neutrophil recruitment into the lung, liver, and kidney. *J. Innate Immun.*, 2013, vol. 5, no. 4, pp. 348–357. doi: 10.1159/000345943
97. Roy S., Khanna S., Nallu K., Hunt T.K., Sen C.K. Dermal wound healing is subject to redox control. *Mol. Ther.*, 2006, vol. 13, iss. 1, pp. 211–220. doi: 10.1016/j.yymthe.2005.07.684
98. Scapini P., Cassatella M.A. Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood*, 2014, vol. 124, iss. 5, pp. 710–719. doi: 10.1182/blood-2014-03-453217
99. Sen C.K. The general case for redox control of wound repair. *Wound Repair Regen.*, 2003, vol. 11, iss. 6, pp. 431–438. doi: 10.1046/j.1524-475X.2003.11607.x
100. Sen C.K. Wound healing essentials: let there be oxygen. *Wound Repair Regen.*, 2009, vol. 17, iss. 1, pp. 1–18. doi: 10.1111/j.1524-475X.2008.00436.x
101. Sen C.K., Roy S. Redox signals in wound healing. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, 2008, vol. 1780, iss. 11, pp. 1348–1361. doi: 10.1016/j.bbagen.2008.01.006
102. Serhan C.N., Chiang N., Van Dyke T.E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, vol. 8, iss. 5, pp. 349–361. doi: 10.1038/nri2294
103. Silvestre-Roig C., Hidalgo A., Soehnlein O. Neutrophil heterogeneity: implications for homeostasis and pathogenesis. *Blood*, 2016, vol. 127, iss. 18, pp. 2173–81. doi: 10.1182/blood-2016-01-688887
104. Sorensen O.E., Cowland J.B., Theilgaard-Monch K., Liu L., Ganz T., Borregaard N. Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors. *J. Immunol.*, 2003, vol. 170, iss. 11, pp. 5583–5589. doi: 10.4049/jimmunol.170.11.5583
105. Stark M.A., Huo Y., Burcin T.L., Morris M.A., Olson T.S., Ley K. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity*, 2005, vol. 22, iss. 3, pp. 285–294. doi: 10.1016/j.immuni.2005.01.011
106. Summers C., Rankin S.M., Condliffe A.M., Singh N., Peters A.M., Chilvers E.R. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.*, 2010, vol. 31, iss. 8, pp. 318–324. doi: 10.1016/j.it.2010.05.006
107. Summers C., Singh N.R., White J.F., Mackenzie I.M., Johnston A., Solanki C., Balan K.K., Peters A.M., Chilvers E.R. Pulmonary retention of primed neutrophils: a novel protective host response, which is impaired in the acute respiratory distress syndrome. *Thorax*, 2014, vol. 69, iss. 7, pp. 623–629. doi: 10.1136/thoraxjnl-2013-204742
108. Tak T., Tesselaar K., Pillay J., Borghans J.A., Koenderman L. What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. *J. Leukoc. Biol.*, 2013, vol. 94, iss. 4, pp. 595–601. doi: 10.1189/jlb.1112571
109. Tamassia N., Bianchetto-Aguilera F., Arruda-Silva F., Gardiman E., Gasperini S., Calzetti F., Cassatella M.A. Cytokine production by human neutrophils: revisiting the “dark side of the moon”. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2018, vol. 48, iss. 52, *Special Issue: Neutrophils: e12952*. doi: 10.1111/eci.12952
110. Theilgaard-Monch K., Knudsen S., Follin P., Borregaard N. The transcriptional activation program of human neutrophils in skin lesions supports their important role in wound healing. *J. Immunol.*, 2004, vol. 172, iss. 12, pp. 7684–7693. doi: 10.4049/jimmunol.172.12.7684
111. Thomson C.H. Biofilms: Do they affect wound healing? *Int. Wound J.*, 2011, vol. 8, iss. 1, pp. 63–67. doi: 10.1111/j.1742-481X.2010.00749.x
112. Thornton R.B., Wiertsema S.P., Kirkham L.A., Rigby P.J., Vijayasekaran S., Coates H.L., Richmond P.C. Neutrophil extracellular traps and bacterial biofilms in middle ear effusion of children with recurrent acute otitis media – a potential treatment target. *PLoS One*, 2013, vol. 8, iss. 2: e53837. doi: 10.1371/journal.pone.0053837
113. Uhl B., Vadlauer Y., Zuchtriegel G., Nekolla K., Sharaf K., Gaertner F., Massberg S., Krombach F., Reichel C.A. Aged neutrophils contribute to the first line of defense in the acute inflammatory response. *Blood*, 2016, vol. 128, iss. 19, pp. 2327–2337. doi: 10.1182/blood-2016-05-718999
114. Von Vietinghoff S., Ley K. Homeostatic regulation of blood neutrophil counts. *J. Immunol.*, 2008, vol. 181, iss. 8, pp. 5183–5188. doi: 10.4049/jimmunol.181.8.5183
115. Wang J. Neutrophils in tissue injury and repair. *Cell Tissue Res.*, 2018, vol. 371, iss. 3, pp. 531–539. doi: 10.1007/s00441-017-2785-7
116. Wang J., Hossain M., Thanabalasuriar A., Gunzer M., Meininger C., Kubes P. Visualizing the function and fate of neutrophils in sterile injury and repair. *Science*, 2017, vol. 358, iss. 6359, pp. 111–116. doi: 10.1126/science.aam9690
117. Widgerow A.D. Cellular resolution of inflammation – catabasis. *Wound Repair Regen.*, 2012, vol. 20, iss. 1, pp. 2–7. doi: 10.1111/j.1524-475X.2011.00754.x
118. Wilgus T.A., Roy S., McDaniel J.C. Neutrophils and wound repair: positive actions and negative reactions. *Adv. Wound Care*, 2013, vol. 2, no. 7, pp. 379–388. doi: 10.1089/wound.2012.0383
119. Wilkes M.C., Mitchell H., Penheiter S.G., Dore J.J., Suzuki K., Edens M., Sharma D.K., Pagano R.E., Leof E.B. Transforming growth factor-beta activation of phosphatidylinositol 3-kinase is independent of Smad2 and Smad3 and regulates fibroblast responses via p21-activated kinase-2. *Cancer Res.*, 2005, vol. 65, iss. 22, pp. 10431–10440. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1522
120. Wu Y.K., Cheng N.C., Cheng C.M. Biofilms in chronic wounds: pathogenesis and diagnosis. *Trends Biotechnol.*, 2019, vol. 37, iss. 5, pp. 505–517. doi: 10.1016/j.tibtech.2018.10.011
121. Wu Y.S., Chen S.N. Apoptotic cell: linkage of inflammation and wound healing. *Front. Pharmacol.*, 2014, vol. 5: 1. doi: 10.3389/fphar.2014.00001
122. Yager D.R., Kulina R.A., Gilman L.A. Wound fluids: a window into the wound environment? *Int. J. Low. Extrem. Wounds.*, 2007, vol. 6, iss. 4, pp. 262–272. doi: 10.1177/1534734607307035
123. Yipp B.G., Kim J.H., Lima R., Zbytnuik L.D., Petri B., Swanlund N., Ho M., Szeto V.G., Tak T., Koenderman L., Pickkers P., Tool A.T.J., Kuijpers T.W., van den Berg T.K., Looney M.R., Krummel M.F., Kubes P. The lung is a host defense niche for immediate neutrophil-mediated vascular protection. *Sci. Immunol.*, 2017, vol. 2, iss. 10: eaam8929. doi: 10.1126/sciimmunol.aam8929
124. Yipp B.G., Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood*, 2013, vol. 122, iss. 16, pp. 2784–2794. doi: 10.1182/blood-2013-04-457671

125. Zhang D., Chen G., Manwani D., Mortha A., Xu C., Faith J.J., Burk R.D., Kunisaki Y., Jang J.E., Scheiermann C., Merad M., Frenette P.S. Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature*, 2015, vol. 525, iss. 7570, pp. 528–532. doi: 10.1038/nature15367
126. Zhang Y. Functions of extracellular pyruvate kinase M2 in tissue repair and regeneration. *Georgia State University*, 2016. 155 p.
127. Zhang Y., Li L., Liu Y., Liu Z.R. PKM2 released by neutrophils at wound site facilitates early wound healing by promoting angiogenesis. *Wound Repair Regen.*, 2016, vol. 24, iss. 2, pp. 328–336. doi: 10.1111/wrr.12411
128. Zhao R., Liang H., Clarke E., Jackson C., Xue M. Inflammation in chronic wounds. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, vol. 17, iss. 12: 2085. doi: 10.3390/ijms17122085

---

**Авторы:**

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

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

**Authors:**

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

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

---

Поступила в редакцию 26.07.2019  
Отправлена на доработку 20.11.2019  
Принята к печати 26.11.2019

---

Received 26.07.2019  
Revision received 20.11.2019  
Accepted 26.11.2019

# ЦИТОКИНЫ И НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ БЕЛКИ ПРИ ВИРУСНЫХ ЭНЦЕФАЛИТАХ И СУДОРОЖНОМ СИНДРОМЕ У ДЕТЕЙ. I. ВИРУСНЫЕ ЭНЦЕФАЛИТЫ

Л.А. Алексеева<sup>1</sup>, Г.Ф. Железникова<sup>1</sup>, Е.Ю. Горелик<sup>1</sup>, Н.В. Скрипченко<sup>1,2</sup>,  
А.А. Жирков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Судорожный синдром у детей развивается в трех формах: фебрильные судороги при острых инфекциях, симптоматические судороги на фоне острой нейроинфекции и дебют эпилепсии, которые требуют тщательной дифференцировки для назначения адекватной терапии. Опасность судорожного синдрома не исчерпывается осложнением текущей инфекции, так как его развитие сопряжено с риском возникновения симптоматической эпилепсии в дальнейшем. Особо выделена постэнцефалитическая эпилепсия, которая развивается у детей в первые годы после перенесенного вирусного энцефалита. Необходимость выявления групп риска развития эпилепсии явилась толчком к поиску биомаркеров эпилептогенеза, отражающих особенности системного и локального воспалительного процесса в центральной нервной системе в ходе иммунного ответа на инфекцию. В качестве кандидатных биомаркеров риска развития эпилепсии изучаются цитокины как главные медиаторы воспаления, способные также оказывать влияние на эпилептогенез. С другой стороны, в качестве маркеров поражения клеток мозга при нейроинфекциях и эпилепсии изучаются нейроспецифические белки, известные как биомаркеры воспаления при разных заболеваниях центральной нервной системы. В обзоре представлены сведения, касающиеся возможности использования биомаркеров воспаления (цитокинов и нейроспецифических белков) для диагностики и мониторинга неврологических заболеваний с судорожным синдромом у детей. В первой части обзора описаны результаты определения биомаркеров воспаления в крови и ликворе при острых вирусных энцефалитах/энцефалопатии, ассоциированных с разными нейротропными вирусами (герпесвирусы, флавивирусы, энтеровирусы). Обсуждается значимость различных биомаркеров в прогнозировании исхода и отдаленных последствий заболевания.

**Ключевые слова:** цитокины, хемокины, нейроспецифические белки, вирусный энцефалит, энцефалопатия, судорожный синдром, дети.

---

#### Адрес для переписки:

Железникова Галина Федоровна  
197002, Россия, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 9,  
Детский Научно-клинический Центр Инфекционных Болезней.  
Тел.: 8 905 267-41-32 (моб.).  
E-mail: zheleznikova.galina@gmail.com

#### Contacts:

Galina F. Zheleznikova  
197002, Russian Federation, St. Petersburg, Prof. Popova str., 9,  
Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases.  
Phone: +7 905 267-41-32 (mobile).  
E-mail: zheleznikova.galina@gmail.com

---

#### Библиографическое описание:

Алексеева Л.А., Железникова Г.Ф., Горелик Е.Ю., Скрипченко Н.В.,  
Жирков А.А. Цитокины и нейроспецифические белки при вирусных  
энцефалитах и судорожном синдроме у детей. I. Вирусные  
энцефалиты // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 4. С. 625–638.  
doi: 10.15789/2220-7619-CAN-1448

#### Citation:

Alekseeva L.A., Zheleznikova G.F., Gorelik E.Y., Skripchenko N.V., Zhirkov A.A.  
Cytokines and neuron-specific proteins in pediatric viral encephalitis and  
convulsive syndrome. I. Viral encephalitis // Russian Journal of Infection  
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 4, pp. 625–638.  
doi: 10.15789/2220-7619-CAN-1448

© Алексеева Л.А. и соавт., 2020

**DOI:** <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-CAN-1448>

## CYTOKINES AND NEURON-SPECIFIC PROTEINS IN PEDIATRIC VIRAL ENCEPHALITIS AND CONVULSIVE SYNDROME. I. VIRAL ENCEPHALITIS

Alekseeva L.A.<sup>a</sup>, Zheleznikova G.F.<sup>a</sup>, Gorelik E.Y.<sup>a</sup>, Skripchenko N.V.<sup>a,b</sup>, Zhirkov A.A.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup> St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** Convulsive syndrome in children is manifested in the three forms: febrile convulsions in acute infections, symptomatic convulsions during acute neuroinfection, as well as onset of epilepsy requiring careful differentiation to prescribe adequate therapy. A threat of convulsive syndrome spreads beyond complications related to ongoing infection, because its development is associated with the risk of emerging symptomatic epilepsy in the future. Postencephalitic epilepsy developing in children within the first years after viral encephalitis has been specifically highlighted. A necessity to identify groups at risk of developing epilepsy gave a momentum to seek out for biomarkers of epileptogenesis reflecting the features of systemic and local inflammatory process in the central nervous system during the immune response to infection. Cytokines mainly mediating inflammation are currently examined being studied as candidate biomarkers of the risk of epilepsy. On the other hand, neuron-specific proteins known as inflammation biomarkers identified in various diseases of the central nervous system are being investigated to reveal brain cell injury in neuroinfections and epilepsy. Here we review publications assessing a potential to use inflammation biomarkers (cytokines and neuron-specific proteins) to diagnose and monitor pediatric neurological diseases associated with convulsive syndrome. The first part of the review describes the results of determining the inflammation biomarkers in the blood and cerebrospinal fluid during acute viral encephalitis/encephalopathy associated with various neurotropic viruses (herpes viruses, flaviviruses, enteroviruses). A significance of diverse biomarkers in predicting an outcome and long-term disease consequences are discussed.

**Key words:** cytokines, chemokines, neurospecific proteins, viral encephalitis, encephalopathy, convulsive syndrome, children.

### Введение

Судороги являются одним из наиболее грозных осложнений инфекционных заболеваний у детей. В целом у детей дошкольного возраста (от 5 мес. до 6 лет) наиболее часто возникают фебрильные судороги (ФС), основным триггером которых служит лихорадка (повышение температуры тела выше 38°C), которая при возрастной незрелости структур головного мозга и/или генетически обусловленной предрасположенности вызывает патологическую возбудимость нейронов с развитием пароксизмов, чаще в виде генерализованных тонико-клонических судорог, без признаков инфекционного поражения мозга. Пароксизмы продолжительностью не более 10–15 мин называют «простыми» ФС, тогда как ФС продолжительностью более 30 мин часто обозначают как «фебрильный эпилептический статус» (ФЭС). Длительные ФС могут трансформироваться в афебрильные судороги и эпилепсию, в частности фармакорезистентную височную эпилепсию [12].

В практике инфекционного стационара при наличии судорожного синдрома (СС) у детей возникает необходимость проводить дифференциальную диагностику трех состояний: ФС при острых инфекциях, симптоматических судорог на фоне острой нейроинфекции и дебюта эпилепсии. Так, анализ 486 случаев СС, развившегося у детей в возрасте от 0 до 17 лет, выявил 414 пациентов с ФС на фоне острой инфекции, 34 пациента с острой нейроинфекцией и 38 детей с эпилепсией. Основной этиологи-

ческий спектр возбудителей острых инфекций с ФС составили герпесвирус человека 6 типа (HHV-6) — 30%, вирус Эпштейна–Барр (EBV) — 8%, вирус гриппа и другие респираторные вирусы (РВ) — вместе 29%, ротавирус — 8% [11]. Такие же три группы пациентов из общего числа детей с СС в возрасте от 6 месяцев до 15 лет ( $n = 114$ ) выделили другие исследователи, подтвердившие к тому же особую роль HHV-6 в патогенезе СС у детей [3].

При острых нейроинфекциях у детей СС обычно развивается в первые три дня болезни (вирусный энцефалит (ВЭ) или бактериальный менингит/менингоэнцефалит [МЭ]). В первые трое суток нейроинфекции СС может возникать на фоне как диффузного неспецифического поражения мозга (отек и ишемия), так и очагового поражения нейронов мозга [11]. Но опасность СС не исчерпывается осложнением текущей острой нейроинфекции. Перенесенный при ВЭ СС повышает риск развития симптоматической эпилепсии в дальнейшем, о чем свидетельствуют данные ряда авторов, отраженные в обзоре [4]. Так, многолетнее изучение последствий перенесенного ВЭ у 99 детей в возрасте от 2 месяцев до 17 лет (40 мальчиков и 59 девочек) позволило установить, что развитие эпилепсии коррелирует с манифестацией судорог при ВЭ ( $p < 0,001$ ) [40]. Еще в первой декаде века Lee W. и соавт. [30], изучая условия развития постэнцефалитической эпилепсии (ПЭЭП) у 56 (16%) из 330 детей, перенесших острый энцефалит (ОЭ), определили, что ПЭЭП чаще всего развивается через 6 месяцев после ОЭ и почти

во всех случаях (94%) менее чем через 3 года. Необходимость дифференцировки разных судорожных состояний у детей, а также выявления групп риска развития эпилепсии послужила толчком к поиску биомаркеров эпилептогенеза, который в последние десятилетия приобрел характер отдельного направления. Общим условием развития ФС при острых инфекциях и симптоматических судорог при нейроинфекциях является системный и/или локальный воспалительный процесс, развивающийся в ходе иммунного ответа на инфекцию. В патогенезе идиопатической эпилепсии (в том числе у детей) также значительную роль играют процессы воспаления в центральной нервной системе (ЦНС) [29, 39]. Важная цель исследований в области эпилепсии состоит в идентификации взаимосвязанных механизмов воспаления при системных и неврологических заболеваниях, которые в дальнейшем могут вести к развитию эпилепсии [39]. В связи с этим главные регуляторные молекулы воспаления — цитокины — являются предметом исследований в качестве кандидатных биомаркеров риска эпилепсии. По данным экспериментальных исследований, многие цитокины способны влиять на эпилептогенез. Так, провоспалительные IL-1 $\beta$  и IL-8 повышают риск развития судорог, тогда как противовоспалительные IL-1Ra (рецепторный антагонист IL-1) и IL-10 оказывают антиконвульсивный эффект [52]. Другая группа молекул — нейроспецифические белки (НСБ) — изучается как маркер тяжести повреждения мозга при судорогах, связанных с острой инфекцией или эпилепсией [4]. В данном обзоре представлены работы в этом направлении, опубликованные за 5–7 последних лет в отечественной и зарубежной литературе.

## Цитокины при вирусных энцефалитах

Представляет интерес выяснить, существуют ли какие-либо особенности системного и локального цитокинового ответа при ВЭ, индуцированных разными вирусами и ассоциированных с различной частотой и тяжестью СС.

По данным многих авторов, острые симптоматические судороги чаще всего развиваются при ВЭ, вызванном вирусом простого герпеса 1 или 2 типа (HSV-1,2) [4]. Действительно, отечественные исследователи [2] недавно наблюдали 20 случаев HSV-энцефалита (HSV-Э) у детей в возрасте от 4 месяцев до 15 лет. В остром периоде болезни генерализованные тонико-клонические судороги отмечены у 18 детей (90%); у всех пациентов младше 3 лет (14 из 14) и у 4 из 6 пациентов в возрасте от 7 до 15 лет. Сходные данные получили Kalita J. и соавт. [24], отметив при обследовании 40 пациентов (взрослых

и детей) с HSV-Э судорожные припадки в большинстве (83%) случаев, а эпилептический статус у 48% пациентов. Кроме того, через год после выписки в 36% случаев диагностирована ПЭЭП, в подтверждение прежних наблюдений [30]. Судороги считают наиболее типичным клиническим проявлением HSV-Э, что, вероятно, связано с локализацией процесса в эпилептогенной зоне — лобно-височной лимбической коре [24].

К сожалению, публикации относительно уровня цитокинов в биологических средах при ВЭ у детей в последние годы встречались очень редко, что побудило нас расширить диапазон поиска за счет аналогичных исследований у взрослых. В конце первой декады XXI в. Kamei S. и соавт. [26] сравнили содержание интерлейкина-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), фактора некроза опухолей- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), интерферона- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), IL-6, IL-2 и IL-10 в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) 20 взрослых пациентов с «хорошим» (n = 13) и «плохим» (n = 7) исходом HSV-Э. Оказалось, что у пациентов с плохим исходом при поступлении в уровни IFN $\gamma$  и IL-6 ЦСЖ были достоверно выше. Ichiyama T. и соавт. [23] обнаружили, что в ЦСЖ взрослых пациентов с HSV-Э (n = 13) содержание IFN $\gamma$ , IL-6, IL-10 и sTNFR1 (soluble TNF receptor 1) значительно превышает уровень контроля, а концентрации IFN $\gamma$  и sTNFR1 к тому же достоверно выше, чем у пациентов с острым негерпетическим лимбическим энцефалитом (n = 15). Однако позднее другая группа авторов [32], обследуя 38 взрослых пациентов с инфекционным энцефалитом, из которых у 17 был диагностирован HSV-Э, не обнаружила существенных различий уровня цитокинов при HSV-Э и энцефалитах другой инфекционной этиологии, отметив, что концентрации IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, а также IL-8 и CCL2/MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) были значительно выше в ЦСЖ, чем в сыворотке больных. Только сывороточный уровень IL-1 $\alpha$  оказался выше именно при HSV-Э.

В России чаще всего встречается инфекция, вызванная членом семейства *Flaviviridae* из группы арбовирусов (arthropod-borne viruses), — вирусом клещевого энцефалита (ВКЭ; tick-borne encephalitis virus, TBEV), которая протекает в трех клинических формах: лихорадочной (ЛФ, без поражения ЦНС), менингеальной (менингит) и очаговой (МЭ). До 2% всех случаев клещевого энцефалита (КЭ) составляют хронические формы, одной из которых является кожевниковская эпилепсия (*epilepsia partialis continua*) [8]. По данным тех же авторов [8], у детей в возрасте от 1 года до 15 лет (n = 291) с инфекцией ВКЭ лихорадочная форма (ЛФ) диагностирована в 28% случаев, менингеальная форма (МФ) в 50% случаев,

а очаговая (ОФ, собственно КЭ) — в 20% случаев. Судороги отмечены редко при ЛФ — у 4 (4,5%) детей младше 4 лет при температуре тела выше 39°C (ФС), а у большинства (65,5%) больных с очаговой формой (ОФ) — генерализованные судорожные приступы на фоне прогрессирующего угнетения сознания. У 16 (27,7%) пациентов с ОФ инфекции развился хронический КЭ с эпилептическим синдромом. Из 44 детей, поступивших с диагнозом «хронический КЭ», у 26 (59%) эпилептический синдром оказался резистентен к терапии, и приступы приобрели статусное течение.

Изучив сывороточный уровень ряда цитокинов у 199 детей с клещевыми инфекциями, вызванными ВКЭ или *Borrelia burgdorferi*, Попонникова Т.В. и соавт. [9] обнаружили сходные параметры системного цитокинового ответа в острой фазе болезни, независимо от того, была ли это моноинфекция ВКЭ или микст-инфекция, хотя последняя характеризовалась более тяжелым течением. Установлено, что низкий сывороточный уровень IFN $\gamma$ , отражающий слабый противовирусный иммунный ответ Th1 типа, ассоциирован с появлением очаговых изменений в ЦНС, что согласуется с нашими прежними наблюдениями [5]. Крылова Н.В. и соавт. [7] сравнили содержание 7 цитокинов (IL-8, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-6, IL-4, IL-10) в сыворотке и надосадке культур цельной крови в трех группах взрослых пациентов: с ЛФ КЭ (n = 28) и ОФ с благоприятным (n = 16) или летальным исходом (n = 6). В остром периоде ЛФ КЭ отметили значительный подъем сывороточных концентраций IL-8, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$  (относительно уровня у здоровых лиц), тогда как при ОФ с благоприятным исходом такого накопления цитокинов в крови не наблюдали. При крайне тяжелой ОФ КЭ с летальным исходом наблюдали уже гиперпродукцию этих цитокинов с 3–10-кратным превышением контрольного уровня. Независимо от исхода, при ОФ были достоверно повышены (относительно контроля) концентрации IL-6, IL-4 и IL-10, с их максимальным накоплением в крови у пациентов с летальным исходом. Помимо этого, у пациентов с ОФ оказалась сниженной стимулированная митогеном продукция цитокинов в культуре, особенно TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$  у пациентов с летальным исходом ОФ КЭ. Эти результаты подтверждают ключевую роль IL-8, IL-1 $\beta$  и цитокинов Th1 типа (TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$ ) в системном ответе против ВКЭ, предотвращающем вовлечение ЦНС при ЛФ, а также рост противовоспалительного компонента цитокинового ответа (IL-4 и IL-10) при развитии энцефалита. В поиске прогностических критериев дифференцировки клинических форм КЭ другие отечественные авторы [6] исследовали спонтанную

секрецию IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-4 и IL-10 в надосадке культур мононуклеаров (Мо) крови у взрослых с ЛФ (n = 22), МФ (n = 23) и ОФ (n = 15) инфекции ВКЭ. Установлено, что спонтанная продукция IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  у всех больных КЭ существенно превышала уровень контроля (здоровые лица). При этом концентрации IFN $\alpha$  и IFN $\gamma$  в супернатантах больных МФ и в особенности ОФ оказались значительно ниже, чем у больных ЛФ КЭ, тогда как секреция TNF $\alpha$ , напротив, нарастала от ЛФ к ОФ, как и соотношение TNF $\alpha$ /IL-4. Спонтанная продукция IL-10 также была достоверно выше у пациентов с ОФ, чем ЛФ, вероятно, как механизм негативной регуляции чрезмерной продукции TNF $\alpha$  Мо крови.

Целый ряд исследований посвящен оценке продукции хемокинов при КЭ, суммированных в обзоре [14]. Хемокины (малые индуцибельные цитокины с хемоаттрактантными свойствами) часто имеют двойное обозначение — по современной классификации, основанной на структурных особенностях, и прежней, функциональной. По данным разных авторов [14], в сыворотке пациентов с КЭ обнаружен рост содержания хемокинов CCL3/MIP-1 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ ), CXCL10/IP-10 (IFN $\gamma$ -induced peptide-10) и CXCL13/BCA-1 (B-lymphocyte chemoattractant), а в ЦСЖ — CCL2/MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL5/RANTES (regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted), CXCL10/IP-10, CXCL11/I-TAC (IFN $\gamma$ -induced T-cell  $\alpha$ -chemoattractant), CXCL12/SDF-1 $\alpha$  (stromal cell-derived factor-1) и CXCL13/BCA-1. К примеру, Zajkowska J. и соавт. [53] определили содержание CXCL10/IP-10, CXCL11/I-TAC, CXCL12/SDF-1 $\alpha$ , CXCL13/BCA-1 в сыворотке и ЦСЖ у 23 взрослых пациентов с КЭ до и после лечения, в сравнении с данными контрольной группы (8 пациентов без воспалительных заболеваний ЦНС). Концентрации CXCL10 и CXCL13 (хемоаттрактанты для Th1- и В-клеток соответственно) в сыворотке, а также CXCL10, CXCL11, CXCL12 и CXCL13 в ЦСЖ пациентов с КЭ при поступлении оказались значительно выше показателей в группе контроля, что характеризует эти хемокины как хорошие биомаркеры воспаления в ЦНС при КЭ.

Позднее интратекальный ответ цитокинов при КЭ изучили Fowler A. и соавт. [19], определив содержание 16 цитокинов/хемокинов в ЦСЖ у 37 детей разного возраста (от 4 месяцев до 17 лет) в острой фазе КЭ с поражением ЦНС. В большинстве проб ЦСЖ концентрации IL-1 $\beta$ , рецепторного антагониста IL-1 (IL-1Ra), IL-7, IL-15 и IL-17 не превышали порог чувствительности метода определения. Значимых корреляций уровня цитокинов/хемокинов

в острой фазе с тяжестью болезни не обнаружено. Разделив пациентов по отсутствию или наличию отдаленных неврологических последствий, авторы отметили, что последствия чаще возникали у девочек (10/11), чем у мальчиков (4/11), и что группа детей с последствиями в целом старше, чем без них (средний возраст 11,4 против 7,4 лет,  $p = 0,02$ ). В острой фазе болезни уровни в ЦСЖ  $IFN\gamma$ , IL-4, IL-6 и IL-8 были значительно выше у детей с последствиями, чем без них, причем в обеих группах средние концентрации IL-6 на порядок превышали уровни остальных трех цитокинов. Интересно отметить, что концентрации в ликворе IL-4, IL-6 и IL-8 достоверно нарастали с возрастом пациентов независимо от пола. Авторы заключают, что высокие концентрации этих цитокинов в ликворе отражают выраженность воспаления в ЦНС и могут служить прогностическими критериями риска неполного выздоровления детей с КЭ. Недавно Grygorczuk S. и соавт. [20] оценили системный и локальный цитокиновый ответ цитокинов Th17 типа (IL-17A, IL-17F, IL-22) и хемокинов — хемоаттрактантов для нейтрофилов (CXCL8/IL-8, CXCL1/MIP-2 $\alpha$ , CXCL2/MIP-2 $\beta$ ), определив их содержание в сыворотке и ЦСЖ взрослых пациентов с КЭ (менингит или МЭ) при поступлении и через 2 недели от начала болезни. В сыворотке пациентов с КЭ обнаружен значительный рост (относительно контроля) концентраций IL-17A, а в ЦСЖ — всех трех цитокинов Th17 типа, особенно IL-22. Содержание CXCL1 в ЦСЖ коррелировало с числом нейтрофилов и было более высоким у пациентов с МЭ, чем с менингитом, а уровень IL-8 был выше в ЦСЖ, чем в сыворотке. Ответ цитокинов Th17 типа, системный (IL-17A) и локальный (IL-22) ассоциирован с быстрым исчезновением из ЦСЖ нейтрофилов и благоприятным исходом болезни.

Другой представитель семейства *Flaviviridae* — вирус японского энцефалита (ВЯЭ, JEV), особенно распространен в странах Юго-Восточной Азии. По данным ВОЗ, в 2011 г. зарегистрировано 16 700 случаев ЯЭ, из которых 75% составляли дети в возрасте от 0 до 14 лет [14]. Острая инфекция JEV, как и ВКЭ, проявляется в трех клинических формах: неспецифическая лихорадка (nonspecific febrile illness), менингит или энцефалит. Типичным клиническим проявлением JEV-энцефалита (ЯЭ) являются двигательные нарушения, а главной зоной поражения мозга — таламус. Ранее было показано, что ЯЭ достоверно ассоциирован с риском развития ПЭЭП у детей [30]. В дальнейшем Misra U. и Kalita J. [33] наблюдали судороги у 32 из 59 (54%) пациентов (взрослые и дети) с ЯЭ, из них у 8 отмечен эпилептический статус. Позднее те же авторы в другой группе пациентов с ЯЭ

( $n = 97$ , из них 30% дети) наблюдали СС в 46% случаев, из них в 18% эпилептический статус. Неврологические последствия через год после выписки развились у половины (52%) из пациентов группы, однако ПЭЭП диагностирована только у одного пациента (1%) [24].

В первой декаде XXI в. было показано значительное накопление CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES и CXCL10/IP-10 в крови и ЦСЖ пациентов с ЯЭ, в прямой корреляции с тяжестью болезни. Спектр хемокинов в ЦСЖ при ЯЭ отличается от спектра при КЭ отсутствием хемоаттрактанта для В-клеток CXCL13 [14]. Kalita J. и соавт. [25] определили уровень 11 цитокинов и хемокинов в ЦСЖ у 14 пациентов с ВЭ (возраст от 6 до 55 лет), из которых ЯЭ диагностирован у 8. Судороги отмечены у 6 из 14 пациентов. В ликворе больных обнаружено значительно повышенное содержание IL-6, IL-8 и CCL5/RANTES, тогда как концентрации IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-10, IL-12p70 и CCL2/MCP-1 не отличались от уровня в группе контроля. Авторы не нашли корреляций между содержанием в ЦСЖ цитокинов/хемокинов и тяжестью болезни, наличием двигательных нарушений или отклонений при МРТ.

Судорожный синдром относительно редко развивается при энтеровирусных энцефалитах (EVE), которые составляют 3–8% от всех случаев энтеровирусной инфекции. Миоклонические судороги (миоклонус) чаще ассоциированы с EV71 стволовым энцефалитом (EV71 СЭ) [49]. Авторы обзора [49] рассмотрели сообщения первой декады века об ответе цитокинов при EV71 СЭ. Показано, что содержание в плазме крови IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF $\alpha$  значительно нарастает с усугублением тяжести и развитием фатальных осложнений EV71 СЭ (отек легких или дисрегуляция автономной нервной системы). В большинстве случаев концентрации IL-13 (но не IL-4) также превышали норму. В ликворе пациентов обнаружено накопление IL-6, совпадающее по времени с вовлечением ЦНС при EV71-инфекции, сопоставимое при разных неврологических синдромах. В собственном исследовании авторов обзора (Wang S. и соавт., 2008) изучались концентрации CCL5/RANTES, индуцированных  $IFN\gamma$  хемокинов CXCL10/IP-10 и CXCL9/MIG (monokine induced by  $IFN\gamma$ ), а также хемоаттрактанта моноцитов CCL2/MCP-1 и нейтрофилов IL-8/CXCL8 в сыворотке крови и ЦСЖ детей ( $n = 31$ ) с EV71 СЭ разной степени тяжести. Содержание всех перечисленных хемокинов в плазме было значительно выше при осложненном, чем при неосложненном течении EV71 СЭ, однако в ЦСЖ это различие наблюдали только в отношении CXCL9/MIG. Соотношение уровней MCP-1 и IL-8 в ЦСЖ и плазме было максимальным при неос-

ложном EV71 СЭ, снижаясь с развитием осложнений за счет роста их концентраций в крови. Интересно отметить, что уровень CCL5/RANTES не возрастал ни в крови, ни в ЦСЖ пациентов независимо от тяжести EV71 СЭ, в отличие от данных, полученных при ЯЭ [14, 25], КЭ [14] или HSV-Э [32].

Позднее китайские исследователи [50] изучили системный и локальный ответ цитокинов/хемокинов в трех группах детей: с легким («hand, foot, and mouth disease», HFMD), тяжелым и критическим течением EV71-инфекции. Тяжелое течение характеризовалось вовлечением ЦНС с разнообразными неврологическими симптомами, включая миоклонус. Критическое течение диагностировали при наличии комы, легочной недостаточности или сосудистого коллапса. При поступлении уровни IL-1 $\beta$  и IL-6 (но не TNF $\alpha$ , IL-10, а также CXCL8/IL-8 и других хемокинов) в плазме крови пациентов с тяжелым течением оказались значительно выше по сравнению с показателями при HFMD. Критическое течение характеризовалось дополнительным ростом (относительно тяжелого течения) содержания в крови IL-6, IL-10 и хемокина IL-8, но не CXCL10/IP-10, CCL2/MCP-1, CXCL9/MIG и CCL5/RANTES. В ЦСЖ детей с тяжелым или критическим течением инфекции уровень IL-6, IL-8 и CXCL10/IP-10 был выше, а CCL5/RANTES — еще ниже, чем в плазме. У пациентов с поражением ЦНС (тяжелое течение) содержание IL-6, IP-10 и IL-8 в ЦСЖ (но не в плазме) коррелировало с числом лейкоцитов, нейтрофилов и моноцитов в крови, что свидетельствует о связи процессов, происходящих в ЦНС, с выраженностью системного воспаления при EV71-инфекции.

Еще один EV — вирус Коксаки A16 (CV-A16) — также часто служит причиной HFMD у детей, но редко вызывает энцефалит. Zhang S. и соавт. [54] сравнили содержание 12 цитокинов (включая цитокины Th17 IL-17A, IL-22 и IL-23) в сыворотке крови (и ЦСЖ при энцефалите) у детей с EV71 HFMD (без энцефалита) (n = 34) или CV-A16 HFMD (n = 18), с энцефалитом при EV71-инфекции (n = 24) или сочетании обоих EV (n = 16). Сывороточные уровни 5 цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-2, TNF $\alpha$ , IL-4 и IL-22) в остром периоде EV71 HFMD оказались значительно выше, чем при CV-A16 HFMD. У пациентов с энцефалитом концентрации в крови 9 из 12 цитокинов (IFN $\gamma$ , IL-2, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-13, IL-22, IL-23) были существенно выше (p < 0,05), чем у пациентов с HFMD. Сравнение цитокинового ответа у детей с EV71-инфекцией (энцефалит и HFMD без энцефалита) позволило выделить два цитокина — IFN $\gamma$  и IL-5, уровни которых значительно возрастали с развитием энцефалита (p < 0,001). В ликворе детей с энцефалитом, вы-

званным моноинфекцией EV71 или сочетанием EV71 с CV-A16, в последнем случае уровень IL-6 оказался значительно ниже (при сходном содержании остальных цитокинов). Дальнейший анализ показал, что развитие энцефалита достоверно ассоциировано с младшим возрастом, EV71-инфекцией и повышенным содержанием в крови цитокинов Th2 (IL-4, IL-5) и Th17 (IL-22 и IL-23).

Нейротропностью обладает и коронавирус (CoV), РНК-содержащий вирус из семейства *Coronaviridae*, который вызывает тяжелый острый респираторный синдром (SARS), реже — заболевания ЦНС у детей и взрослых. Li Y. и соавт. [31] провели скрининг CoV-инфекции у 286 госпитализированных детей с острой инфекцией респираторного тракта (ИРТ) и 183 с острым энцефалитоподобным синдромом (ЭПС). CoV-инфекцию установили по наличию анти-CoV IgM антител у 26 детей первой группы и 22 — второй. Возраст этих детей составлял от 1 месяца до 6 лет, в обеих группах преобладали мальчики (~80%). Только у 5 детей (23%) с CoV-ЭПС наблюдали судороги. Сравнение экспрессии 17 цитокинов/хемокинов в этих двух группах и группе контроля (здоровые дети) показало, что при поступлении уровни большинства цитокинов/хемокинов в сыворотке крови детей с CoV-ИРТ и CoV-ЭПС не различались между собой и не отличались от нормы. Только содержание в сыворотке G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) значительно превышало уровень контроля в обеих группах с CoV-инфекцией, а концентрации GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) были существенно выше у пациентов с ЭПС, чем ИРТ. В ликворе детей с CoV-ЭПС содержание IL-6, IL-8, MCP-1 и GM-CSF значительно превышало их уровень в крови, что предполагает участие резидентных клеток мозга в их продукции.

Особый интерес представляет ответ цитокинов при HHV-6 инфекции, чаще всего ассоциированной с ФС у детей [3, 11]. Более того, Симонова Е.В. и соавт. [10] установили доминирующую роль HHV-6-инфекции у детей с диагнозами: судорожный синдром, эпилепсия, острый ВЭ, нейропатия. Опубликовано много фактических данных о связи между инфекцией HHV-6 и ФС [18, 34] или височной эпилепсией [32], однако патогенетическая роль HHV-6 в генезе судорожных состояний пока не доказана [15]. По-видимому, из двух типов вируса как с ФС, так и с височной эпилепсией ассоциирован HHV-6B, но не HHV-6A [18, 34].

В обзоре [13] упомянуты прежние работы об индукции цитокинов *in vitro* в мононуклеарах крови (РВМС) человека, инфицированных HHV-6. Вирус способен стимулировать в РВМС

синтез провоспалительных цитокинов  $\text{TNF}\alpha$  и  $\text{IL-1}\beta$  (но не  $\text{IL-6}$ ), а также иммуносупрессивного  $\text{IL-10}$ , одновременно подавляя продукцию  $\text{IL-2}$  и  $\text{IL-12}$ , что способствует переключению иммунного ответа от эффективного  $\text{Th1}$ - к менее эффективному  $\text{Th2}$ -профилю. С целью получения базисных данных о продукции цитокинов/хемокинов при первичной  $\text{HHV-6}$ -инфекции Yoshikawa T. и соавт. [51] определили у 20 детей в динамике острой первичной  $\text{HHV-6}$ -инфекции (установленной по наличию в крови ДНК вируса при отсутствии анти- $\text{HHV-6}$  IgG-антител) сывороточные уровни 14 цитокинов/хемокинов по сравнению с показателями у здоровых детей ( $n = 14$ ). В острой фазе болезни оказались значительно повышенными концентрации трех цитокинов ( $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{IL-2}$  и  $\text{IL-4}$ ) и хемокинов  $\text{CCL2/MCP-1}$ , тогда как в фазе реконвалесценции наблюдали рост уровня  $\text{IL-5}$ . Позднее другая группа японских авторов [36] в расширенном исследовании изучила содержание 40 цитокинов/хемокинов в сыворотке крови 25 детей с острой первичной  $\text{HHV-6B}$ -инфекцией по сравнению с группой контроля (25 пациентов без лихорадки) и группой детей с лихорадкой, вызванной другими возбудителями (не  $\text{HHV-6B}$ ,  $n = 8$ ). В острой фазе первичной  $\text{HHV-6B}$ -инфекции обнаружен существенный рост уровня в крови четырех хемокинов ( $\text{CXCL10/IP-10}$ ,  $\text{CXCL11/I-TAC}$ ,  $\text{CXCL16/SIC/SCYB}$  (small inducible cytokine B) и  $\text{CCL2/MCP-1}$ ) по сравнению с контролем. Сравнение с группой детей, переносящих другие (не  $\text{HHV-6B}$ ) инфекции, выявило только одну особенность — более высокий уровень  $\text{CXCL11}$  (хемоаттрактанта для  $\text{Th1}$ ) у пациентов с  $\text{HHV-6B}$ -, чем с не  $\text{HHV-6B}$ -инфекцией.

В доступной литературе нам встретились лишь несколько публикаций японских авторов, касающихся цитокинового ответа у детей с энцефалопатией (ЭП) на фоне  $\text{HHV-6}$ -инфекции [22, 27, 28, 47]. Ichiyama T. и соавт. [22] измерили концентрации 7 цитокинов в сыворотке и ликворе 15 детей с острой энцефалопатией (ОЭП) и, в качестве контроля, у 12 детей с ФС, ассоциированными с  $\text{HHV-6}$ -инфекцией. У детей с ОЭП и неврологическими последствиями ( $n = 9$ ) сывороточные уровни  $\text{IL-6}$ ,  $\text{IL-10}$  и  $\text{sTNFR1}$ , а также содержание  $\text{IL-6}$  и  $\text{sTNFR1}$  в ЦСЖ были значительно выше, чем у детей с ФС. Более того, в группе ОЭП концентрации двух факторов ( $\text{IL-6}$  и  $\text{sTNFR1}$ ) в крови и  $\text{IL-6}$  в ЦСЖ у детей с неврологическими последствиями ОЭП оказались значительно выше, чем у детей без таковых ( $n = 6$ ). Важно отметить, что у детей с ОЭП концентрации всех перечисленных цитокинов были существенно выше в крови, чем в ЦСЖ. Авторы предполагают, что мощный системный цитокиновый ответ опосредует патогенез ОЭП

при  $\text{HHV-6}$ -инфекции, при этом высокие концентрации  $\text{IL-6}$  и  $\text{sTNFR1}$  в крови, а также  $\text{IL-6}$  в ЦСЖ могут служить предикторами неврологических последствий ОЭП. Kawabe S. и соавт. [27] также определили содержание 7 цитокинов в сыворотке крови и ликворе 13 детей с ОЭП, развившейся на фоне  $\text{HHV-6}$ -инфекции. ДНК  $\text{HHV-6}$  была обнаружена в ликворе только у 7 пациентов, при этом количество копий вирусной ДНК оказалось значительно выше в сыворотке, чем в ЦСЖ ( $p = 0,003$ ). Концентрации  $\text{IL-6}$  были сходными в крови и ЦСЖ, тогда как содержание  $\text{IL-10}$  было значительно выше в сыворотке, чем в ЦСЖ, и только хемокин  $\text{IL-8}$  обнаруживался на более высоком уровне в ЦСЖ, чем в крови. Отсутствие или низкий уровень ДНК вируса в ЦСЖ противоречит представлению о проникновении  $\text{HHV-6}$  в мозг как главной причине развития ОЭП у детей с  $\text{HHV-6}$ -инфекцией. Авторы полагают, что в патогенезе ОЭП у детей с  $\text{HHV-6}$ -инфекцией большое значение имеет накопление в ликворе  $\text{IL-8}$ . Кроме того, Kawamura Y. и соавт. [28] сравнили содержание цитокинов в ЦСЖ детей младшего возраста с энцефалитом, развившимся при первичной  $\text{HHV-6}$ -инфекции ( $n = 22$ , из них у 13 были судороги), и 7 взрослых реципиентов трансплантата стволовых клеток с лимбическим энцефалитом, связанным с реактивацией  $\text{HHV-6}$ -инфекции. В последнем случае число копий ДНК вируса в ЦСЖ оказалось очень высоким, многократно превышающим значения в первой группе пациентов, однако не обнаружено различий уровня цитокинов в ЦСЖ двух групп пациентов с  $\text{HHV-6}$ -Э. По сравнению с соответствующим контролем у пациентов первой группы в ЦСЖ наблюдали рост концентраций  $\text{IL-6}$  и  $\text{IL-8}$ , а во второй —  $\text{IL-6}$ ,  $\text{IL-8}$  и  $\text{IL-10}$ . В острую фазу болезни у детей с  $\text{HHV-6}$ -Э содержание  $\text{IL-6}$  в ЦСЖ было вдвое выше ( $p < 0,05$ ) при наличии неврологических последствий (гемиплегия, квадриплегия, умственная отсталость), чем без них. Затем Tanuma N. и соавт. [47] определили содержание трех цитокинов ( $\text{IL-6}$ ,  $\text{TNF}\alpha$  и  $\text{IL-10}$ ) в ЦСЖ 16 детей с ОЭП и 10 с ФС (без признаков поражения ЦНС) при  $\text{HHV-6}$ -инфекции, а также 15 детей группы контроля с лихорадкой, но без инфекции в ЦНС. Только 5 из 16 детей с ОЭП и все 10 с ФС выздоровели без неврологических последствий. Средний уровень  $\text{IL-6}$  был на порядок выше в ЦСЖ детей с ОЭП, чем с ФС или группы контроля (75 пг/мл vs 6 и 3 пг/мл,  $p < 0,05$ ), как и средний уровень  $\text{TNF}\alpha$  (3,4 пг/мл vs 0,3 и 0,1 пг/мл,  $p < 0,05$ ). Не обнаружено достоверных различий содержания  $\text{IL-10}$  в ЦСЖ детей этих трех групп, а также корреляций между уровнем трех цитокинов и наличием неврологических последствий ОЭП.

## Нейроспецифические белки при вирусных энцефалитах

Нейроспецифические белки (НСБ) активно изучаются в последние десятилетия как биомаркеры повреждения мозга при травмах, а также острых и хронических заболеваниях ЦНС различного генеза. Подводя промежуточные итоги исследований в этом направлении, авторы обзора [41] выделяют белок S-100 и нейронспецифическую энолазу (NSE) как наиболее перспективные показатели для дальнейшего изучения НСБ в области патофизиологии инфекций ЦНС у детей и взрослых. Кальций-связывающие белки S-100 составляют большое семейство малых кислых протеинов размером 10–12 kDa, представленных субъединицами А и В. Для ЦНС характерен S-100B, который синтезируют астроциты, олигодендроциты и шванновские клетки. NSE представляет собой стабильный клеточно-специфичный изоэнзим гликолитического фермента энолазы, димерный протеин, состоящий из субъединиц  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ . В ЦНС NSE ( $\gamma$ -энолаза) сконцентрирована в цитоплазме нейронов и при повреждении их мембраны легко диффундирует в межклеточное пространство и ЦСЖ.

Нейроспецифические белки неоднократно определялись при вирусных и бактериальных менингитах, в том числе в нашем собственном исследовании [1]. Однако при ВЭ НСБ мало изучены, особенно у детей. В прежних единичных исследованиях установлено, что при острых энцефалитах/энцефалопатии (Э/ЭП) у детей растет содержание S-100 и NSE в сыворотке и ликворе, в ассоциации с тяжестью болезни и неблагоприятным исходом. Отмечено, что накопление в крови S-100 и NSE происходит не всегда одновременно, отражая повреждение преимущественно глии или нейронов соответственно [41].

В самом начале XXI в. Studahl M. и соавт [44] сравнили содержание NSE, S-100, GFAP (glial fibrillary acidic protein) и NFP (neurofilament protein) в ЦСЖ у 13 пациентов с HSV-1 энцефалитом и 15 с КЭ (ТВЕ) в динамике болезни. У пациентов с HSV-1-Э в остром периоде обнаружены значительно более высокие концентрации в ЦСЖ всех изучаемых биомаркеров повреждения мозга, чем у пациентов с КЭ. Содержание большинства НСБ в ЦСЖ пациентов с HSV-1-Э снижалось в течение 45 дней от начала болезни. Исключение составил NFP (маркер повреждения аксонов), уровень которого возрастал на 2-й неделе болезни и оставался экстремально высоким в течение нескольких месяцев. Накопление в ЦСЖ этих маркеров при HSV-1-Э демонстрирует повреждение нейронов (NFP, NSE) и астроглии (S-100, GFAP), тогда как

большинство пациентов с КЭ имели признаки лишь легкого астроглиоза, за исключением двух случаев более тяжелого течения с развитием пареза. Позднее те же авторы [45] сравнили содержание S-100B в сыворотке и ЦСЖ 17 взрослых пациентов с HSV-Э и 15 — с КЭ, в остром периоде энцефалита. Судороги отмечены у 10 пациентов с HSV-Э и ни у одного — с КЭ. Средние концентрации S-100B в острой фазе HSV-Э в крови и ЦСЖ на порядок превышали показатели при КЭ и в группе контроля. Однако сывороточный уровень S-100B в острой фазе не коррелировал с исходом HSV-Э, оцененном по шкале GOS (Glasgow Outcome Scale) через 6 месяцев после выписки. Авторы подчеркивают возможность определения уровня S-100B не только в ЦСЖ, но и в сыворотке крови для мониторинга повреждения ЦНС в инициальной фазе HSV-Э, но не КЭ.

Намного позднее, в уже упомянутом исследовании Fowler A. и соавт. [19], наряду с 16 цитокинами/хемокинами были измерены концентрации S100B, NSE, GFAP и тау-протеина (tau) в ЦСЖ 37 детей с КЭ в острой фазе болезни. Протеин тау обильно представлен в аксонах нейронов и в свободном виде является маркером их повреждения. Концентрации всех НСБ не коррелировали с тяжестью болезни, возрастом, полом пациентов и сроком спинномозговой пункции от начала болезни. Содержание в ликворе S100B и GFAP в большинстве случаев не достигало порога чувствительности метода. Только средние концентрации тау имели тенденцию к повышению у детей с отдаленными последствиями КЭ, тогда как содержание в ЦСЖ NSE оказалось выше у детей с хорошим исходом КЭ, чем у детей с последствиями ( $p = 0,04$ ). Авторы заключают, что при КЭ у детей маркеры повреждения клеток ЦНС менее полезны в прогнозе отдаленных последствий, чем маркеры воспаления. Однако позже Czupryna P. и соавт. [16] установили высокую информативность определения NSE при КЭ с поражением ЦНС у взрослых. Авторы определили содержание S100B и NSE в сыворотке и ЦСЖ у 43 (не вакцинированных ранее против ВКЭ) пациентов с КЭ в форме МЭ ( $n = 17$ ) или менингита ( $n = 26$ ), при поступлении и через 2 недели терапии. Концентрации NSE в ЦСЖ (но не в сыворотке) при поступлении были значительно выше у больных с МЭ, чем с менингитом, дифференцируя эти две группы пациентов ( $p = 0,0002$ ). Через 2 недели содержание NSE в сыворотке нарастало, особенно у пациентов с неврологическими или психиатрическими последствиями МЭ через 1 месяц после выписки, дифференцируя этих больных от пациентов без последствий ( $p = 0,0001$ ). Концентрации S100B в обеих сре-

дах не различались в группах пациентов с КЭ и контрольной (13 пациентов без признаков воспаления в ЦНС).

С другой стороны, Park J. и соавт. [37] показали информативность уровня S-100B в ЦСЖ при нейроинфекциях разной этиологии и ассоциацию его подъема с повреждением нейронов. Определив концентрацию S-100B в острой фазе болезни у 62 взрослых пациентов с нейроинфекцией вирусной ( $n = 44$ , из них 34 с менингитом и 10 с ВЭ), бактериальной ( $n = 6$ ) и туберкулезной ( $n = 12$ ) этиологии, авторы разделили всех пациентов на две группы по наличию признаков повреждения нейронов (ND+) или их отсутствию (ND-). Критерием служили психиатрические или неврологические симптомы (включая судороги) и структурные изменения в паренхиме мозга при МРТ. S-100B был обнаружен в ЦСЖ у 50% пациентов группы ND+ ( $n = 22$ ) и только у 2,5% пациентов группы ND- ( $n = 40$ ),  $p < 0,05$ . При этом среднее содержание S-100B в ликворе пациентов группы ND+ было более чем вдвое ( $p < 0,01$ ) выше, чем в группе ND- и контрольной (40 пациентов без признаков воспаления в ЦНС). Разделение больных по этиологии инфекции не выявило статистически значимых различий. Авторы заключают, что подъем уровня S-100B в ЦСЖ ассоциирован скорее с тяжестью повреждения нейронов, чем с причинным фактором нейроинфекции.

Высокую диагностическую и прогностическую ценность уровня S-100B в ЦСЖ подтвердили и Peng Q. с соавт. [38] в ретроспективном исследовании данных обследования 83 детей с нейроинфекциями и, в качестве контроля, 88 детей без патологии ЦНС. Возраст пациентов составлял от 1 месяца до 16 лет. У 62 детей диагностирован инфекционный энцефалит, у 21 — инфекционный менингит. Этиологический агент установлен только у 31 из 83 больных, из них у 18 — вирусный и 13 — бактериальный. Среди вирусов превалировал EV71 (12 случаев), среди бактерий — *S. pneumoniae* (8 случаев). Концентрации S-100B в ЦСЖ определяли при поступлении (первая неделя от начала болезни), до начала терапии. Перед выпиской по уровню остаточных нарушений оценивали ранний исход болезни. Концентрации S-100B несколько повышались с возрастом детей, не отличаясь у мальчиков и девочек. Средний уровень S-100B был вдвое выше у детей с энцефалитом, чем с менингитом (1,40 мкг/л vs 0,66 мкг/л,  $p < 0,001$ ), при этом у детей с менингитом он оставался на уровне показателя в группе контроля. Содержание в ЦСЖ S-100B  $\geq 0,96$  мкг/л предсказывало диагностику поражения паренхимы мозга при энцефалите. Наряду с клиническими показателями (включая эпилептический ста-

тус) высокий уровень S-100B был ассоциирован с неблагоприятным ранним исходом энцефалита, но один только S-100B выделен как независимый предиктор «плохого» исхода при концентрации 1,77 мкг/л и выше.

В начале 2010-х гг. в Японии описано несколько новых клинических синдромов острой инфекционной энцефалопатии (ОЭП) у детей, одним из которых является клинко-радиологический синдром «ОЭП с двухфазными судорогами и медленной редукцией диффузии» (AESD). Синдром AESD чаще всего ассоциирован с инфекцией HHV-6, встречается в основном у детей первых 2 лет жизни, характеризуется относительно низкой летальностью, но обычно имеет неврологические последствия (включая эпилепсию) [21]. Tanuma N. и соавт. [46] изучили содержание tau (маркера повреждения аксонов) и NSE в ЦСЖ 11 детей в возрасте от 10 месяцев до 3 лет с AESD и группы контроля из 31 ребенка от 1 месяца до 16 лет с лихорадкой, но без инфекции в ЦНС. Инфекционный агент был идентифицирован у 9 из 11 пациентов с AESD, у 7 выявлен HHV-6, у двоих — вирус гриппа А или В. Концентрации tau в контрольной группе оказались максимальными в ликворе 1–3-месячных детей, быстро снижаясь к концу первого года жизни, и у детей от 1 года до 16 лет составляли в среднем 440 пг/мл. В группе пациентов с AESD уровень tau в ЦСЖ оставался нормальным в 1-й день, возрастая с 3-го дня и превышая 1000 пг/мл до 7-го дня болезни. Исходом AESD у 7 из 11 пациентов были неврологические последствия в виде умственной отсталости разной степени тяжести и (в двух случаях) эпилепсии. Независимо от исхода AESD уровень tau в ЦСЖ возрастал после 3-го дня болезни у всех пациентов, но у троих детей, имевших повышенный уровень tau уже на 3-й день болезни, развились впоследствии неврологические осложнения. Концентрации NSE в ЦСЖ были повышены только у 2 из 7 обследованных пациентов. Авторы заключают, что tau является более чувствительным биомаркером, чем NSE, отражая раннее повреждение аксонов при AESD у детей. Позднее те же авторы [47] сравнили содержание цитокинов (см. выше) и tau в ЦСЖ детей младшего возраста с ОЭП или ФС на фоне HHV-6 инфекции. Из 16 пациентов с ОЭП 13 имели синдром AESD. Концентрации tau оказались вдвое выше у пациентов с ОЭП по сравнению с ФС и группой контроля (13 906 пг/мл vs 655 и 609 пг/мл,  $p < 0,05$ ). Накопление tau в ЦСЖ наблюдали с 3-го по 8-й день болезни, в сроки изменения диффузии белого вещества подкорковых структур мозга при МРТ. Однако не обнаружено корреляций между подъемом уровня tau и исходом ОЭП (наличием или отсутствием

неврологических последствий). Авторы [41] заключают, что уровень tau в ЦСЖ может быть чувствительным биомаркером ассоциированной с ННВ-6 ОЭП начиная с 3-го дня болезни, но не имеет веса в прогнозе исхода ОЭП.

Shiuhara T. и соавт. [42] сравнили содержание трех НСБ (S-100, NSE и total tau [tTau]) в сыворотке и ЦСЖ 18 детей с AESD и 43 — с ФС. В сыворотке крови концентрации всех трех НСБ были существенно выше в группе AESD, чем в группе сравнения (ФС), особенно tTau (200 пг/мл vs 31,  $p < 0,001$ ). В ЦСЖ различия сохранялись для S-100 и особенно tTau (1300 пг/мл vs 76,  $p < 0,001$ ), тогда как уровень NSE в ликворе детей с AESD был ниже, чем в сыворотке крови. Выделение подгруппы детей с AESD, обследованных в первые три дня болезни ( $n = 8$ ), показало, что в эти сроки в циркуляции уже несколько растет содержание S-100, но не NSE или tTau, а в ЦСЖ заметно накапливаются S-100 и tTau. Авторы установили, что для ранней диагностики AESD наиболее значима комбинация уровней S-100 и tTau в ЦСЖ пациентов. Далее те же авторы [43] сравнили содержание S-100, NSE и tTau в 336 пробах сыворотки и 200 — ЦСЖ, взятых в первые 5 дней болезни у 313 детей с разными неврологическими заболеваниями, в основном с энцефалитом/ЭП ( $n = 88$ ), ФС ( $n = 51$ ) и афебрильными судорогами (АФС,  $n = 52$ ). Группа контроля (ГК) состояла из 85 детей с инфекциями без вовлечения ЦНС. Средний сывороточный уровень NSE у детей с Э/ЭП превышал значения во всех остальных группах, особенно при сравнении с ФС, АФС и ГК ( $p = 0,01-0,001$ ). Аналогичные различия найдены в отношении содержания в крови tTau, тогда как в ЦСЖ при Э/ЭП было достоверно выше содержание tTau и S-100, чем при ФС и в ГК. Разделив пациентов с Э/ЭП по исходу болезни в баллах mRS (Modified Rankin scale) на «хороший» (1–2 балла) и «плохой» (3–4 балла), авторы обнаружили, что содержание S-100, NSE и tTau в сыворотке или ЦСЖ значительно выше в подгруппе с плохим исходом, чем с хорошим. Однако наиболее специфичным маркером поражения ЦНС авторы считают tTau, уровень которого в ЦСЖ может быть использован для дифференцировки Э/ЭП и ФС, а в сыворотке — для прогноза исхода.

Другие японские авторы [48] оценили уровень двух маркеров повреждения астроцитов — S-100 и GFAP, а также tau в ранних образцах ЦСЖ 23 детей с Э/ЭП. По исходу болезни через 6–12 месяцев после начала дети были разделены на две подгруппы: с хорошим (полное выздоровление или легкие неврологические последствия,  $n = 13$ ) или плохим (тяжелые последствия или смерть,  $n = 10$ ) исходом. Группу контроля составили 27 детей без поражения

ЦНС. Этиологический агент был выявлен у 10 из 13 пациентов с хорошим исходом (вирус гриппа у 6, ННВ-6 у 3 и HSV у одного) и 4 из 10 с плохим (вирус гриппа, EV71, аденовирус и норовирус). Сравнение уровня в ЦСЖ S-100, GFAP и tau показало, что содержание всех трех маркеров значительно выше у пациентов с плохим, чем с хорошим исходом Э/ЭП. При этом в подгруппе с плохим исходом уровень в ЦСЖ S-100 у умерших пациентов ( $n = 3$ ) был значительно выше, чем у выживших ( $n = 7$ ). Точность прогноза плохого исхода Э/ЭП составила 91% для S-100, 74% для GFAP и 78% для tau. Комбинация данных по S-100 и tau повышала точность прогноза до 100%. Авторы подтверждают возможность использования уровня всех трех НСБ в ранних пробах ЦСЖ для прогноза исхода Э/ЭП у детей, с наилучшим эффектом комбинации S-100 и tau.

Dittrich S. и соавт. [17] измерили концентрации S-100, GFAP, tTau и NSE в ЦСЖ 66 пациентов, поступивших в госпиталь Лаоса с тяжелыми нейроинфекциями (ЯЭ, риккетсиозные инфекции, туберкулезный менингит, бактериальный менингит). Группа ЯЭ состояла из 25 пациентов в возрасте от 8 до 20 лет, из них у 12 отмечены судороги. В этой группе обратил на себя внимание самый высокий уровень tTau, в 4–5 раз превышающий показатели во всех остальных группах пациентов. В общей группе пациентов ( $n = 66$ ) содержание в ликворе tTau (но не S-100, GFAP и NSE) высоко достоверно ( $p < 0,001$ ) коррелировало с синдромом острого энцефалита и наличием судорог. Величина индекса альбумина (ЦСЖ/кровь) — показателя проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) — находилась в корреляции с содержанием GFAP и NSE, но не tTau. Быстрое накопление в ликворе tTau при умеренном подъеме NSE указывает на поражение преимущественно аксонов, но не тел нейронов, в остром периоде ЯЭ [17].

Недавно Motojima Y. и соавт. [35] предприняли ретроспективный анализ данных 33 детей, госпитализированных с ФЭС, которые по окончательному диагнозу были разделены на две группы: острый Э/ЭП ( $n = 20$ ) и ФС ( $n = 13$ ). Средний возраст детей с энцефалитом/ЭП составлял 2 года и 11 месяцев, а с ФС — 3 года и 8 месяцев. У пациентов двух групп сравнили содержание tau и IL-6 в ЦСЖ при поступлении, а также уровень ферментов печени АСТ (аспартатаминотрансфераза), АЛТ (аланинаминотрансфераза) и ЛДГ (лактатдегидрогеназа) в сыворотке крови, взятой на 3-й день пика обострения. У пациентов с Э/ЭП перед выпиской оценивали исход болезни по наличию ( $n = 13$ ) или отсутствию ( $n = 7$ ) регресса развития. Не обнаружено ста-

статистически существенных отличий группы Э/ЭП от ФС по уровню tau (320 vs 180 пг/дл,  $p > 0,05$ ) или IL-6 в ЦСЖ. Однако разделение группы Э/ЭП по исходу болезни выявило 10-кратное превышение среднего уровня tau у пациентов с регрессией развития (2190 vs 185 пг/дл). Детальный анализ показал, что содержание tau в ликворе более 1000 пг/дл ассоциировано с риском регрессии развития у детей с Э/ЭП. Интересно, что у детей с Э/ЭП содержание АСТ, АЛТ и ЛДГ в крови значительно превышало показатели при ФС, а ЛДГ и в подгруппе Э/ЭП с плохим исходом (577 vs 327 U/L,  $p = 0,04$ ). Авторы заключают, что уровень tau в ЦСЖ может быть ранним прогностическим критерием исхода Э/ЭП, а сывороточные концентрации АСТ, АЛТ и ЛДГ могут способствовать ранней диагностике Э/ЭП и/или прогнозу исхода болезни.

## Заключение

В последние годы происходило накопление данных о возможности использования цитокинов и НСБ в качестве биомаркеров ВЭ, имеющих диагностическую или прогностическую значимость. Сравнительно больше сведений получено в отношении провоспалительных цитокинов, являющихся одновременно факторами эффективного противовирусного ответа и медиаторами воспаления в чувствительных тканях ЦНС. В целом представленные результаты подтверждают ключевую роль системного цитокинового ответа в клинических проявлениях инфекции нейротропными вирусами. Слабая системная продукция IFN $\gamma$  (а также IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  и IL-8) на ранних сроках инфекции способствует проникновению вируса в ЦНС и развитию энцефалита, что показано на примере инфекции ВКЭ [5, 7, 9] или EV71 [49, 50, 54]. Распространение вируса в ЦНС влечет за собой вторичный, усиленный подъем цитокинов в циркуляции, с добавлением противовоспалительного компонента (IL-10, IL-4, IL-13) [7, 49, 50, 54]. Образование очагов воспаления в ЦНС сопровождается накоплением в ЦСЖ и крови IL-6, общего маркера нейроиммунного воспаления [7, 19, 22, 25, 26, 27, 28, 31, 47, 49, 50]. Показана информативность уровня цитокинов (IL-6 и других) в крови или ЦСЖ в остром периоде для прогноза исхода болезни или наличия отдаленных неврологических последствий HSV-Э [26], КЭ [7], ЯЭ [19] и HHV-6-Э [22, 28].

Из описанных типов ВЭ только CoV-Э относительно редко сопровождался судорогами — в 23% случаев против 46–90% при энцефалитах, вызванных остальными нейротропными вирусами. В этом отношении представляет интерес тот факт, что системная продукция

большинства цитокинов/хемокинов при CoV-инфекции (с энцефалитом или без) не отличалась от базального уровня, хотя в ЦСЖ пациентов с CoV-Э был отмечен подъем уровня IL-8 и IL-6 [31]. Ответ цитокинов при ВЭ, вызванном «эпилептогенным» вирусом HHV-6, мало изучен, но данные [22, 27] также дают основание предполагать ведущую роль системной продукции основных цитокинов противовирусного ответа в его патогенезе.

Изучение НСБ как биомаркеров ВЭ начато сравнительно недавно и пока носит фрагментарный характер, касаясь ВЭ, вызванных HSV, HHV-6, ВКЭ, ВЯЭ или ВЭ смешанной этиологии. Суммируя эти сведения, отметим, что ряд сообщений указывает на высокую диагностическую или прогностическую информативность определения S-100 в сыворотке крови и/или ЦСЖ пациентов с HSV-Э (но не КЭ) [44, 45], нейроинфекциями разной этиологии [37, 38], острым Э/ЭП [42, 43, 48]. Перспективным биомаркером ВЭ может также служить протеин tau (маркер повреждения аксонов), уровень которого в ЦСЖ имеет диагностическую значимость [42, 43, 46, 47], а в сыворотке коррелирует с исходом острой ЭП у детей [42]. Особого упоминания заслуживает обнаруженная Dittrich S. с соавт. [17] выраженная корреляция уровня tau в ЦСЖ с наличием судорог. По-видимому, менее нейроспецифична NSE, источником которой могут быть, кроме ЦНС, нейроэндокринные клетки других органов и тканей [42]. Из недавних сообщений лишь два указывают на информативность определения NSE, например в ЦСЖ при КЭ у взрослых [16] или в сыворотке крови у детей с Э/ЭП [43].

Только в одном исследовании из представленных в обзоре одновременно определен уровень широкого спектра цитокинов и ряда НСБ у детей с КЭ и дана сравнительная оценка клинической информативности биомаркеров двух этих типов [19]. Фактические данные свидетельствуют, что результаты определения цитокинов и НСБ зависят от возраста пациентов [19, 38, 46] и могут различаться у детей и взрослых. Особый интерес представляет сравнение уровня НСБ у пациентов с HSV-Э и КЭ, подтвердившее различия патогенеза этих заболеваний [44, 45]. В перспективе большую теоретическую и практическую ценность будет иметь сравнительная оценка уровня цитокинов и НСБ в крови и ЦСЖ детей при ВЭ, вызванных разными вирусами и ассоциированных с разной выраженностью СС в острой фазе и неодинаковым риском развития эпилепсии в отдаленные сроки. К примеру, это может касаться HSV-Э и ЯЭ, сходных по тяжести болезни в острой фазе, но различающихся по клиническим проявлениям, локализации процесса, исходу энцефалита и риску отдаленных последствий, в том числе эпилепсии [24, 33].

## Список литературы/References

1. Алексеева Л.А., Скрипченко Н.В., Бессонова Т.В., Монахова Н.Е., Григорьев С.Г. Маркеры повреждения нейронов и глии в цереброспинальной жидкости при менингитах у детей // Клиническая лабораторная диагностика. 2017. Т. 62, № 4. С. 204–210. [Alekseeva L.A., Skripchenko N.V., Bessonova T.V., Monakhova N.E., Grigoriev S.G. The markers of damage of neurons and glia in cerebrospinal liquor under meningitis in children. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2017, vol. 62, no. 4, pp. 204–210. doi: 10.18821/0869-2084-2017-62-4-204-210 (In Russ.)]
2. Белялетдинова И.Х., Голосная Г.С., Митрофанова И.В., Прыткова М.И. Клинико-лабораторная характеристика энцефалитов, вызванных вирусом простого герпеса у детей // Лечение и профилактика. 2016. Т. 20, № 4. С. 64–68. [Belyaletdinova I.K., Golosnaya G.S., Mitrofanova I.V., Prytkova M.I. The clinical laboratory characteristic of encephalitis in children brought on by virus of herpes simplex. *Lechenie i profilaktika = Disease Treatment and Prevention*, 2016, vol. 20, no. 4, pp. 64–68. (In Russ.)]
3. Вашура Л.В., Савенкова М.С., Заваденко Н.Н. Роль герпесвирусов в генезе судорожных состояний у детей: современный взгляд на проблему // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. 2016. Т. 95, № 4. С. 203–208. [Vashura L.V., Savenkova M.S., Zavadenko N.N. The role of herpes viruses in the genesis of convulsive states in children: a modern approach to the problem. *Pediatriya. Zhurnal im. G.N. Speranskogo = Pediatrics. Journal named after G.N. Speransky*, 2016, vol. 95, no. 4, pp. 203–208. (In Russ.)]
4. Горелик Е.Ю., Войтенков В.Б., Скрипченко Н.В., Вильниц А.А., Иванова М.В., Клишкин А.В. Острые нейроинфекции и симптоматическая эпилепсия у детей: причинно-следственные связи (обзор литературы) // Журнал инфектологии. 2017. Т. 9, № 3. С. 5–13. [Gorelik E.Yu., Voitenkov V.B., Skripchenko N.V., Vilnits A.A., Ivanova M.V., Klimkin A.V. Acute neuroinfections and symptomatic epilepsy in children: causal relationship (review). *Zhurnal infektologii = Journal Infectology*, 2017, vol. 9, no. 3, pp. 5–13. doi: 10.22625/2072-6732-2017-9-3-5-13 (In Russ.)]
5. Железникова Г.Ф., Скрипченко Н.В., Моргацкий Н.В., Монахова Н.Е., Керимова Л.В. Иммунопатогенетические особенности клещевого энцефалита у детей и эффект терапии // Нейроиммунология. 2008. Т. 6, № 1–2. С. 13–22. [Zheleznikova G.F., Skripchenko N.V., Morgatskiy N.V., Monakhova N.E., Kerimova L.V. Immunopathogenetic features of tick-borne encephalitis in children and the effect of therapy. *Neuroimmunologiya = Neuroimmunology*, 2008, vol. 6, no. 1–2, pp. 13–22. (In Russ.)]
6. Ильинских Н.Н., Замятина Е.В., Ильинских Е.Н., Полежаев В.С. Иммуноцитологические прогностические критерии острого клещевого энцефалита // Современные проблемы науки и образования. 2018. № 2. С. 31. [Ilinskikh N.N., Zamyatina E.V., Ilinskikh E.N., Polezhaev V.S. Immunologic and cytologic predictional of acute tick-borne encephalitis. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2018, no. 2, pp. 31. (In Russ.)]
7. Крылова Н.В., Леонова Г.Н., Павленко Е.В., Запорожец Т.С., Смолина Т.П., Гажа А.К., Новиков Д.В., Ченцова И.В. Комплексная оценка состояния иммунной системы при различных формах клещевого энцефалита в остром периоде // Медицинская иммунология. 2012. Т. 14, № 4–5. С. 313–320. [Krylova N.V., Leonova G.N., Pavlenko E.V., Zaporozhets T.S., Smolina T.P., Gazha A.K., Novikov D.V., Chenzova I.V. Comprehensive assessment of immune system in various forms of tick-borne encephalitis in acute phase. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, vol. 14, no. 4–5, pp. 313–320. doi: 10.15789/1563-0625-2012-4-5-313-320 (In Russ.)]
8. Попонникова Т.В., Галиева Г.Ю., Новикова В.Э., Галаганова Л.Г. Клещевой энцефалит у детей: особенности клиники и дифференциальной диагностики в современных условиях // Русский журнал детской неврологии. 2011. Т. 6, № 2. С. 11–24. [Poponnikova T.V., Galieva G.Yu., Novikova V.E., Galaganova L.G. Tick-borne encephalitis in children: characteristics of clinical picture and differential diagnostics under modern conditions. *Russkii zhurnal detskoj neurologii = Russian Journal of Child Neurology*, 2011, vol. 6, no. 2, pp. 11–24. (In Russ.)]
9. Попонникова Т.В., Бедарева Т.Ю., Вахрамеева Т.Н., Галиева Г.Ю. Цитокиновый профиль в остром периоде клещевых нейроинфекций у детей // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2010. Т. 110, № 5. С. 9–12. [Poponnikova T.V., Bedareva T.Iu., Vakhrameeva T.N., Galieva G.Yu. The cytokine profile in acute period of tick-borne neuroinfections in children. *Zhurnal neurologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova = S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*, 2010, vol. 110, no. 5, pp. 9–12. (In Russ.)]
10. Симонова Е.В., Харламова Ф.С., Учайкин В.Ф., Дроздова И.М., Егорова Н.Ю. Поражение центральной нервной системы при герпесвирусной моно- и микст-инфекции 6-го типа у детей // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. 2016. Т. 95, № 2. С. 22–29. [Simonova E.V., Harlamova F.S., Uchaykina V.F., Drozdova I.M., Egorova N.Yu. CNS disorders caused by herpesvirus mono- and mixed infection of type 6 in children. *Pediatriya. Zhurnal im. G.N. Speranskogo = Pediatrics. Journal named after G.N. Speransky*, 2016, vol. 95, no. 2, pp. 22–29. (In Russ.)]
11. Скрипченко Н.В., Кривошеенко Е.М., Команцев В.Н., Горелик Е.Ю., Минченко С.И. Гетерогенность судорожного синдрома при инфекционных заболеваниях у детей. В кн.: Нейроинфекции у детей. СПб., 2015. С. 691–707. [Skripchenko N.V., Krivosheenko E.M., Komantsev V.N., Gorelik E.Yu., Minchenko S.I. Heterogeneity of convulsive syndrome in infectious diseases in children. In: *Neuroinfection in children. St. Petersburg*, 2015, pp. 691–707. (In Russ.)]
12. Студеникин В.М., Турсунхужаева С.Ш., Шелковский В.И., Пак Л.А. Фебрильные судороги у детей: теоретические и практические аспекты // Вопросы практической педиатрии. 2010. Т. 5, № 2. С. 66–74. [Studenikin V.M., Tursunkhuzhaeva S.Sh., Shelkovsky V.I., Pak L.A. Febrile seizures in pediatric patients: theoretical and practical aspects. *Voprosy prakticheskoi pediatrii = Clinical Practice in Pediatrics*, 2010, vol. 5, no. 2, pp. 66–74. (In Russ.)]
13. Agut H., Bonnafous P., Gautheret-Dejean A. Laboratory and clinical aspects of human herpesvirus 6 infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2015, vol. 28, no. 2, pp. 313–335. doi: 10.1128/CMR.00122-14
14. Bardina S., Lim J. The role of chemokines in the pathogenesis of neurotropic flaviviruses. *Immunol. Res.*, 2012, vol. 54, no. 1–3, pp. 121–132. doi: 10.1007/s12026-012-8333-3
15. Bartolini L., Theodore W., Jacobson S., Gaillard W. Infection with HHV-6 and its role in epilepsy. *Epilepsy Res.*, 2019, vol. 153, pp. 34–39. doi: 10.1016/j.epilepsyres.2019.03.016

16. Czupryna P., Grygorczuk S., Pancewicz S., Świerzbńska R., Zajkowska J., Krawczuk K., Dunaj J., Filipiuk J., Kruszewska E., Borawski K., Moniuszko-Malinowska A. Evaluation of NSE and S100B in patients with tick-borne encephalitis. *Brain Behav.*, 2018, vol. 8, no. 12: e01160. doi: 10.1002/brb3.1160
17. Ditttrich S., Sunyakumthorn P., Rattanavong S., Phetsouvanh R., Panyanivong P., Sengduangphachanh A., Phouminh P., Anantatat T., Chanthongthip A., Lee S., Dubot-Pères A., Day N., Paris D., Newton P., Turner G. Blood-brain barrier function and biomarkers of central nervous system injury in rickettsial versus other neurological infections in Laos. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2015, vol. 93, no. 2, pp. 232–237. doi: 10.4269/ajtmh.15-0119
18. Epstein L., Shinnar S., Hesdorffer D., Nordli D., Hamidullah A., Benn E., Pellock J., Frank L., Lewis D., Moshe S., Shinnar R., Sun S. Human herpesvirus 6 and 7 in febrile status epilepticus: the FEBSTAT study. *Epilepsia*, 2012, vol. 53, no. 9, pp. 1481–1488. doi: 10.1111/j.1528-1167.2012.03542.x
19. Fowler A., Ygberg S., Bogdanovic G., Wickström R. Biomarkers in cerebrospinal fluid of children with tick-borne encephalitis: association with long-term outcome. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2016, vol. 35, no. 9, pp. 961–966. doi: 10.1097/INF.0000000000001210
20. Grygorczuk S., Świerzbńska R., Kondrusik M., Dunaj J., Czupryna P., Moniuszko A., Siemieniako A., Pancewicz S. The intrathecal expression and pathogenetic role of Th17 cytokines and CXCR2-binding chemokines in tick-borne encephalitis. *J. Neuroinflammation.*, 2018, vol. 15, no. 1, pp. 115–135. doi: 10.1186/s12974-018-1138-0
21. Hoshino A., Saitoh M., Oka A., Okumura A., Kubota M., Saito Y., Takanashi J., Hirose S., Yamagata T., Yamanouchi H., Mizuguchi M. Epidemiology of acute encephalopathy in Japan, with emphasis on the association of viruses and syndromes. *Brain Dev.*, 2012, vol. 34, no. 5, pp. 337–343. doi: 10.1016/j.braindev.2011.07.012
22. Ichiyama T., Ito Y., Kubota M., Yamazaki T., Nakamura K., Furukawa S. Serum and cerebrospinal fluid levels of cytokines in acute encephalopathy associated with human herpesvirus-6 infection. *Brain Dev.*, 2009, vol. 31, no. 10, pp. 731–738. doi: 10.1016/j.braindev.2008.11.005
23. Ichiyama T., Shoji H., Takahashi Y., Matsushige T., Kajimoto M., Inuzuka T., Furukawa S. Cerebrospinal fluid levels of cytokines in non-herpetic acute limbic encephalitis: comparison with herpes simplex encephalitis. *Cytokine*, 2008, vol. 44, no. 1, pp. 149–153. doi: 10.1016/j.cyto.2008.07.002
24. Kalita J., Misra U., Mani V., Bhoi S. Can we differentiate between herpes simplex encephalitis and Japanese encephalitis? *J. Neurol. Sci.*, 2016, vol. 366, pp. 110–115. doi: 10.1016/j.jns.2016.05.017
25. Kalita J., Srivastava R., Mishra M., Basu A., Misra U. Cytokines and chemokines in viral encephalitis: a clinico-radiological correlation. *Neurosci. Lett.*, 2010, vol. 473, no. 1, pp. 48–51. doi: 10.1016/j.neulet.2010.02.017
26. Kamei S., Taira N., Ishihara M., Sekizawa T., Morita A., Miki K., Shiota H., Kanno A., Suzuki Y., Mizutani T., Itoyama Y., Morishima T., Hirayanagi K. Prognostic value of cerebrospinal fluid cytokine changes in herpes simplex virus encephalitis. *Cytokine*, 2009, vol. 46, no. 2, pp. 187–193. doi: 10.1016/j.cyto.2009.01.004
27. Kawabe S., Ito Y., Ohta R., Sofue A., Gotoh K., Morishima T., Kimura H. Comparison of the levels of human herpesvirus 6 (HHV6) DNA and cytokines in the cerebrospinal fluid and serum of children with HHV-6 encephalopathy. *J. Med. Virol.*, 2010, vol. 82, no. 8, pp. 1410–1415. doi: 10.1002/jmv.21808
28. Kawamura Y., Nakayama A., Kato T., Miura H., Ishihara N., Ihira M., Takahashi Y., Matsuda K., Yoshikawa T. Pathogenic role of human herpesvirus 6B infection in mesial temporal lobe epilepsy. *J. Infect. Dis.*, 2015, vol. 212, no. 7, pp. 1014–1021. doi: 10.1093/infdis/jiv160
29. Koh S. Role of neuroinflammation in evolution of childhood epilepsy. *J. Child. Neurol.*, 2018, vol. 33, no. 1, pp. 64–72. doi: 10.1177/0883073817739528
30. Lee W., Yu T., Chang W., Shau W. Risk factors for postencephalitic epilepsy in children: a hospital-based study in Taiwan. *Eur. J. Paediatr. Neurol.*, 2007, vol. 11, no. 5, pp. 302–309. doi: 10.1016/j.ejpn.2007.02.011
31. Li Y., Li H., Fan R., Wen B., Zhang J., Cao X., Wang C., Song Z., Li S., Li X., Lv X., Qu X., Huang R., Liu W. Coronavirus infections in the central nervous system and respiratory tract show distinct features in hospitalized children. *Intervirology*, 2016, vol. 59, no. 3, pp. 163–169. doi: 10.1159/000453066
32. Michael B., Griffiths M., Granerod J., Brown D., Davies N., Borrow R., Solomon T. Characteristic cytokine and chemokine profiles in encephalitis of infectious, immune-mediated, and unknown aetiology. *PLoS One*, 2016, vol. 11, no. 1: e0146288. doi: 10.1371/journal.pone.0146288
33. Misra U., Kalita J. Seizures in encephalitis: predictors and outcome. *Seizure*, 2009, vol. 18, no. 8, pp. 583–587. doi: 10.1016/j.seizure.2009.06.003
34. Mohammadpour T., Gainza-Lein M., Jafarpour S., Brinegar K., Kapur K., Loddenkemper T. HHV-6 and seizure: A systematic review and meta-analysis. *J. Med. Virol.*, 2017, vol. 89, no. 1, pp. 161–169. doi: 10.1002/jmv.24594
35. Motojima Y., Nagura M., Asano Y., Arakawa H., Takada E., Sakurai Y., Moriwaki K., Tamura M. Diagnostic and prognostic factors for acute encephalopathy. *Pediatr. Int.*, 2016, vol. 58, no. 11, pp. 1188–1192. doi: 10.1111/ped.12995
36. Nagasaka M., Morioka I., Kawabata A., Yamagishi Y., Iwatani S., Taniguchi-Ikeda M., Ishida A., Iijima K., Mori Y. Comprehensive analysis of serum cytokines/chemokines in febrile children with primary human herpes virus-6B infection. *J. Infect. Chemother.*, 2016, vol. 22, no. 9, pp. 593–598. doi: 10.1016/j.jiac.2016.05.010
37. Park J., Suh G., Shin H. Association between cerebrospinal fluid S100B protein and neuronal damage in patients with central nervous system infections. *Yonsei Med J.*, 2013, vol. 54, no. 3, pp. 567–571. doi: 10.3349/ymj.2013.54.3.567
38. Peng Q., Tao S., Yu N., Zhou X., Peng Y., Fu N. Elevated levels of cerebrospinal fluid S100B are associated with brain injury and unfavorable outcomes in children with central nervous system infections. *Int. J. Neurosci.*, 2017, vol. 127, no. 1, pp. 1–9. doi: 10.3109/00207454.2015.1135334
39. Rana A., Musto A. The role of inflammation in the development of epilepsy. *J. Neuroinflammation*, 2018, vol. 15, no. 1, p. 144. doi: 10.1186/s12974-018-1192-7
40. Rismanchi N., Gold J., Sattar S., Glaser C., Sheriff H., Proudfoot J., Mower A., Crawford J., Nespeca M., Wang S. Epilepsy after resolution of presumed childhood encephalitis. *Pediatr. Neurol.*, 2015, vol. 53, no. 1, pp. 65–72. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2015.03.016

41. Rohlwink U., Figaji A. Biomarkers of brain injury in cerebral infections. *Clin. Chem.*, 2014, vol. 60, no. 6, pp. 823–834. doi: 10.1373/clinchem.2013.212472
42. Shiihara T., Miyake T., Izumi S., Watanabe M., Kamayachi K., Kodama K., Nabetani M., Ikemiyagi M., Yamaguchi Y., Sawaura N. Serum and cerebrospinal fluid S100B, neuron-specific enolase, and total tau protein in acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion: a diagnostic validity. *Pediatr. Int.*, 2012, vol. 54, no. 1, pp. 52–55. doi: 10.1111/j.1442-200X.2011.03454.x
43. Shiihara T., Miyake T., Izumi S., Sugihara S., Watanabe M., Takanashi J., Kubota M., Kato M. Serum and CSF biomarkers in acute pediatric neurological disorders. *Brain Dev.*, 2014, vol. 36, no. 6, pp. 489–495. doi: 10.1016/j.braindev.2013.06.011
44. Studahl M., Rosengren L., Günther G., Hagberg L. Difference in pathogenesis between herpes simplex virus type 1 encephalitis and tick-borne encephalitis demonstrated by means of cerebrospinal fluid markers of glial and neuronal destruction. *J. Neurol.*, 2000, vol. 247, no. 8, pp. 636–642. doi: 10.1007/s004150070134
45. Studahl M., Günther G., Rosengren L. Serum S-100B protein levels in patients with herpes simplex encephalitis and tick-borne encephalitis — a marker of CNS damage during the initial stage of disease. *J. Neurol.*, 2009, vol. 256, no. 4, pp. 586–590. doi: 10.1007/s00415-009-0124-y
46. Tanuma N., Miyata R., Kumada S., Kubota M., Takanashi J., Okumura A., Hamano S., Hayashi M. The axonal damage marker tau protein in the cerebrospinal fluid is increased in patients with acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion. *Brain Dev.*, 2010, vol. 32, no. 6, pp. 435–439. doi: 10.1016/j.braindev.2009.07.004
47. Tanuma N., Miyata R., Nakajima K., Okumura A., Kubota M., Hamano S., Hayashi M. Changes in cerebrospinal fluid biomarkers in human herpesvirus-6-associated acute encephalopathy/febrile seizures. *Mediators Inflamm.*, 2014, vol. 2014, pp. 564091. doi: 10.1155/2014/564091
48. Tsukahara H., Fujii Y., Matsubara K., Yamada M., Nagaoka Y., Saito Y., Yashiro M., Tsuge M., Goto S., Kitamura T., Hata A., Ichiyama T., Morishima T. Prognostic value of brain injury biomarkers in acute encephalitis/encephalopathy. *Pediatr. Int.*, 2013, vol. 55, no. 4, pp. 461–464. doi: 10.1111/ped.12094
49. Wang S., Lei H., Liu C. Cytokine immunopathogenesis of enterovirus 71 brain stem encephalitis. *Clin. Dev. Immunol.*, 2012, vol. 2012, pp. 876241. doi: 10.1155/2012/876241
50. Ye N., Gong X., Pang L., Gao W., Zhang Y., Li X., Liu N., Li D., Jin Y., Duan Z. Cytokine responses and correlations thereof with clinical profiles in children with enterovirus 71 infections. *BMC Infect. Dis.*, 2015, vol. 15, pp. 225–234. doi: 10.1186/s12879-015-0965-1
51. Yoshikawa T., Kato Y., Ihira M., Nishimura N., Ozaki T., Kumagai T., Asano Y. Kinetics of cytokine and chemokine responses in patients with primary human herpesvirus 6 infection. *J. Clin. Virol.*, 2011, vol. 50, no. 1, pp. 65–68. doi: 10.1016/j.jcv.2010.09.017
52. Youn Y., Sung I., Lee I. The role of cytokines in seizures: interleukin (IL)-1β, IL-1Ra, IL-8, and IL-10. *Korean J. Pediatr.*, 2013, vol. 56, no. 7, pp. 271–274. doi: 10.3345/kjp.2013.56.7.271
53. Zajkowska J., Moniuszko-Malinowska A., Pancewicz S., Muszyńska-Mazur A., Kondrusik M., Grygorczuk S., Swierzbńska-Pijanowska R., Dunaj J., Czupryna P. Evaluation of CXCL10, CXCL11, CXCL12 and CXCL13 chemokines in serum and cerebrospinal fluid in patients with tick borne encephalitis (TBE). *Adv. Med. Sci.*, 2011, vol. 56, no. 2, pp. 311–317. doi: 10.2478/v10039-011-0033-z
54. Zhang S., Xu M., Xu H., Li X., Ding S., Wang X., Li T., Lu Q. Immunologic characterization of cytokine responses to enterovirus 71 and coxsackie virus A16 infection in children. *Medicine (Baltimore)*, 2015, vol. 94, no. 27, pp. e1137. doi: 10.1097/MD.0000000000001137

**Авторы:**

**Алексеева Л.А.**, д.б.н., руководитель отдела и ведущий научный сотрудник отдела клинической лабораторной диагностики Детского научно-клинического центра инфекционных болезней (ДНК ЦИБ) ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Железникова Г.Ф.**, д.м.н., профессор, старший научный сотрудник отдела клинической лабораторной диагностики ДНК ЦИБ ФМБА Россия, Санкт-Петербург, Россия;

**Горелик Е.Ю.**, к.м.н., научный сотрудник отдела нейроинфекций и органической патологии нервной системы ДНК ЦИБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Скрипченко Н.В.**, д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, зам. директора по научной работе ДНК ЦИБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия; зав. кафедрой инфекционных болезней ФП и ДПО Государственного педиатрического медицинского университета Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;

**Жирков А.А.**, младший научный сотрудник отдела клинической лабораторной диагностики ДНК ЦИБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия.

**Authors:**

**Alekseeva L.A.**, PhD, MD (Biology), Head and Leading Researcher Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases under the Federal Medical Biological Agency (PRCCID), St. Petersburg, Russian Federation;

**Zheleznikova G.F.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Senior Researcher Department of Clinical Laboratory Diagnostics, PRCCID, St. Petersburg, Russian Federation;

**Gorelik E.Y.**, PhD (Medicine), Researcher Department Neuroinfection and organic pathology of the nervous system PRCCID, St. Petersburg, Russian Federation;

**Skripchenko N.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director of Science, PRCCID, St. Petersburg, Russian Federation; Head of the Department of Infectious Diseases of Postgraduate and Continuing Professional Education SPbSPMU of the Ministry of Health of Russia, St. Petersburg, Russian Federation;

**Zhirkov A.A.**, Junior Researcher, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, PRCCID, St. Petersburg, Russian Federation.

# АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ НЕОРГАНИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ: ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ СИСТЕМ

А.А. Мелешко<sup>1</sup>, А.Г. Афиногенова<sup>1,2</sup>, Г.Е. Афиногенов<sup>1</sup>, А.А. Спиридонова<sup>2</sup>, В.П. Толстой<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Наночастицы металлов и оксидов металлов являются перспективными антибактериальными агентами. Они обладают широкой антимикробной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, вирусов, грибов и простейших, а также позволяют избежать развития устойчивости микроорганизмов. В настоящем обзоре кратко отмечены механизмы действия таких наночастиц и основные факторы, влияющие на их антимикробную активность. Особое внимание уделяется современным исследованиям в области разработок нового поколения антимикробных агентов, обладающих усиленным и пролонгированным действием, а также низкой токсичностью. Рассмотрены примеры формирования двойных и тройных наноконструктов на основе оксидов: CuO, ZnO, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Ag<sub>2</sub>O, MnO<sub>2</sub> и ряда других, в том числе допированных различными металлами/неметаллами, например, Ag, Ce, Cr, Mn, Nd, Co, Sn, Fe, N, F и др. Результаты исследований многокомпонентных систем демонстрируют наличие у них более выраженной антибактериальной активности и синергетического эффекта по сравнению с активностью индивидуальных оксидов. Так, например, тройные наноконструкты ZnO–MnO<sub>2</sub>–Cu<sub>2</sub>O или ZnO–Ag<sub>2</sub>O–Ag<sub>2</sub>S показали увеличение зоны ингибирования роста тест-штаммов грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов на 100% по сравнению с ZnO. Такой же удвоенный антибактериальный эффект наблюдали для наночастиц ZnO, допированного церием, или для CuO, допированного цинком. Отмечены работы по созданию наноконструктов на основе наночастиц металлов/оксидов металлов в сочетании с органическими (хитозан, целлюлоза, поливинилпирролидон, биополимеры и др.) или неорганическими материалами со специальной структурой (оксид графена, нанотрубки оксида титана, кремнезем) для достижения долгосрочного и контролируемого высвобождения антибактериальных агентов. Все рассмотренные наноконструкты и их сочетания обладают выраженным пролонгированным антимикробным действием, в том числе в отношении антибиотикорезистентных штаммов, способны предотвращать формирование микробных биопленок на биотических и абиотических поверхностях, обладают низкой токсичностью в отношении эукариотических клеток, в композициях с полимерами (альгинатом натрия, коллагеном, поливинилпирролидоном и др.) демонстрируют противовоспалительные и ранозаживляющие свойства. Использование наноразмерных систем может решить одновременно несколько важных практических задач, таких как сохранение высокой пролонгированной антимикробной активности при одновременном снижении количества используемых соединений, создание новых антимикробных препаратов с низкой токсичностью и уменьшенной экологической нагрузкой на окружающую среду, разработка новых биоцидных материалов, в том числе новых покрытий для эффективной антимикробной защиты изделий медицинского назначения.

**Ключевые слова:** наночастицы металлов, наночастицы оксидов металлов, наноконструкты, антимикробная активность, антибиотикорезистентность, микробные биопленки, пролонгированное действие.

## Адрес для переписки:

Мелешко Александра Александровна  
198504, Россия, Санкт-Петербург, Петергоф,  
Университетский пр., 26, Институт химии СПбГУ.  
Тел.: 8 921 325-67-55. E-mail: Alya\_him@mail.ru

## Contacts:

Aleksandra A. Meleshko  
198504, Russian Federation, St. Petersburg, Petergof,  
Universitetskii pr., 26, Institute of Chemistry,  
St. Petersburg State University.  
Phone: +7 921 325-67-55. E-mail: Alya\_him@mail.ru

## Библиографическое описание:

Мелешко А.А., Афиногенова А.Г., Афиногенов Г.Е., Спиридонова А.А., Толстой В.П. Антибактериальные неорганические агенты: эффективность использования многокомпонентных систем // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 4. С. 639–654. doi: 10.15789/2220-7619-AIA-1512

## Citation:

Meleshko A.A., Afinogenova A.G., Afinogenov G.E., Spiridonova A.A., Tolstoy V.P. Antibacterial inorganic agents: efficiency of using multicomponent systems // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 4, pp. 639–654. doi: 10.15789/2220-7619-AIA-1512

© Мелешко А.А. и соавт., 2020

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-AIA-1512>

**ANTIBACTERIAL INORGANIC AGENTS: EFFICIENCY OF USING MULTICOMPONENT SYSTEMS**Meleshko A.A.<sup>a</sup>, Afinogenova A.G.<sup>a,b</sup>, Afinogenov G.E.<sup>a</sup>, Spiridonova A.A.<sup>b</sup>, Tolstoy V.P.<sup>a</sup><sup>a</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation<sup>b</sup> St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** Metal and metal oxide nanoparticles (NPs) are promising antibacterial agents. They have a broad antimicrobial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria, viruses, and protozoans. The use of NPs reduces the possibility of the microbial resistance development. This review briefly shows the general mechanisms and the main factors of antibacterial activity of NPs. In this article, a comprehensive review of the recent researches in the field of new antimicrobial agents with superior long-term bactericidal activity and low toxicity is provided. The review gives the examples of synthesis of double and triple nanocomposites based on following oxides: CuO, ZnO, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Ag<sub>2</sub>O, MnO<sub>2</sub>, etc. including metal and nonmetal doped nanocomposites (for example with Ag, Ce, Cr, Mn, Nd, Co, Sn, Fe, N, F, etc.). Compared with bactericidal action of individual oxides, the nanocomposites demonstrate superior antibacterial activity and have synergistic effects. For example, the antimicrobial activity of ZnO against both Gram-positive and Gram-negative bacteria was increased by ~100% by formation of triple nanocomposites ZnO–MnO<sub>2</sub>–Cu<sub>2</sub>O or ZnO–Ag<sub>2</sub>O–Ag<sub>2</sub>S. Similar effect was showed for Ce-doped ZnO and Zn-doped CuO. The present article also provides the examples of nanocomposites containing NPs and organic (chitosan, cellulose, polyvinylpyrrolidone, biopolymers, etc.) or inorganic materials with special structure (graphene oxide, TiO<sub>2</sub> nanotubes, silica) which demonstrate controlled release and long-term antibacterial activity. All of the considered nanocomposites and their combinations have a pronounced long-term antimicrobial effect including against antibiotic-resistant strains. They are able to prevent the formation of microbial biofilms on biotic and abiotic surfaces, have low toxicity to eukaryotic cells, demonstrate anti-inflammatory and wound-healing properties in compositions with polymers (sodium alginate, collagen, polyvinylpyrrolidone, etc.). The use of nanoscale systems can solve several important practical problems at the same time: saving of long-term antimicrobial activities while reducing the number of compounds, creation of new antimicrobial agents with low toxicity and reduced environmental impact, development of new biocidal materials, including new coatings for effective antimicrobial protection of medical devices.

**Key words:** metal-based nanoparticles, nanocomposites, antimicrobial activity, antibiotic resistance, microbial biofilms, long-term activity.

**Введение**

Как известно, антибиотики являются одними из наиболее часто назначаемых препаратов, используемых в медицине. Тем не менее до 50% всех антибиотиков, назначаемых людям, не обладают оптимальной эффективностью. Одной из причин этому является бактериальная устойчивость к данному виду препаратов. Это связано, в частности, с такими факторами, как неизбирательное и чрезмерное употребление антибиотиков, их использование в производстве пищевых продуктов [64].

Появление штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий, устойчивых к антибиотикам и обладающих множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), является проблемой общественного здравоохранения и представляет серьезную угрозу для населения [4, 5, 63]. В связи с этим разработка новых антибактериальных агентов относится к приоритетным областям исследований в современной медицине.

Различные металлические наночастицы и наночастицы оксидов металлов являются перспективными кандидатами для новых противомикробных препаратов, так как они обладают широкой антимикробной активностью в отношении бактерий (как грамполо-

жительных, так и грамотрицательных), вирусов, грибов и простейших [12]. Например, разработаны принципиально новые бактерицидные растворы для применения в стоматологии, челюстно-лицевой хирургии, урологии, акушерстве, гинекологии, при ЛОР-заболеваниях, проктологии. Электроимпульсным диспергационно-конденсационным способом получены водные и спиртовые (этиловый спирт) суспензии металлов и их оксидов на основе серебра, диоксида титана, оксида железа, оксида тантала, оксида ванадия, оксида кобальта, диоксида тантала, оксида цинка, оксида меди; суспензия диоксида титана, оксида алюминия и диоксида молибдена. Исследования проводились на микробной культуре зубного налета и смешанной культуре, выделенной из зубодесневых карманов стоматологических пациентов. Все растворы показали высокую пролонгированную в течение 19 дней бактерицидную активность в разведениях от цельного раствора до 1–20 мг/л [6]. Преимущества использования наночастиц металлов и оксидов металлов связано, прежде всего, с тем, что механизм их действия в отношении бактерий отличается от стандартных механизмов действия антибиотиков, что позволяет преодолеть МЛУ [74].

В настоящее время известно множество наночастиц, обладающих антибактериальным действием, например Ag, Cu, Zn, CuO, ZnO, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> и др. Механизмы их действия подробно описаны в литературе, в данном обзоре будут лишь кратко отмечены основные тенденции их использования для этих целей. Также известно, что антимикробная активность наночастиц зависит от их размера, морфологии, концентрации, поверхностного заряда и других факторов. Эти закономерности будут отмечены в данной статье.

Актуальным вопросом в рассматриваемой области является развитие стратегий по разработке нового поколения антибактериальных агентов. Модификация наночастиц (например, допирование) или создание нанокомпозитов из оксидов металлов рассматриваются в качестве перспективных стратегий по усилению антибактериального эффекта одиночных агентов. Ряд исследователей отмечают существование синергетического эффекта от сочетания разных наночастиц, что приводит к улучшению свойств материала. Разработки последних лет, демонстрирующие усиленный антибактериальный эффект от смесей неорганических наночастиц, рассмотрены в данном обзоре.

Еще одной важной задачей для биомедицинского применения является получение материала с пролонгированным и стабильным антибактериальным действием в сочетании с цитосовместимостью и низкой токсичностью. Решения, позволяющие улучшить биодоступность наночастиц, контролировать высвобождение и снизить их токсичность, рассмотрены в финальной части обзора.

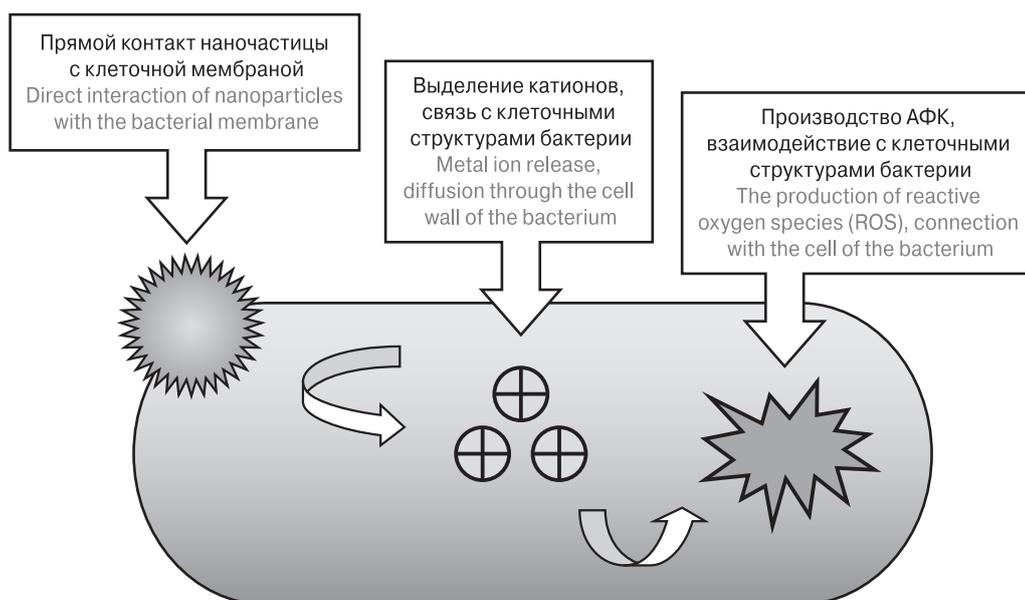
## Основные механизмы антибактериального действия неорганических антибактериальных агентов

Механизмы действия антибактериальных металлических/металл-оксидных наночастиц описаны в большом количестве научных источников [12, 13, 45, 63, 69].

Основные стадии такого действия включают следующие процессы (рис. 1):

1) повреждение клеточных мембран бактерий. Отрицательно заряженные бактериальные клеточные стенки привлекают положительно заряженные наночастицы к своей поверхности вследствие электростатических взаимодействий. Положительно заряженные наночастицы устанавливают прочную связь с мембранами, что приводит к разрушению клеточных стенок бактерий и, следовательно, к увеличению их проницаемости;

2) дестабилизация бактериальной клеточной стенки и мембраны. После прилипания к поверхности бактерий наночастицы могут взаимодействовать с клетками по двум различным механизмам. Наночастицы меньшего размера проникают непосредственно в клетку, в то время как более крупные наночастицы остаются вне бактерий. В обоих случаях наночастицы непрерывно выделяют ионы (Ag<sup>+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>). Эти ионы связываются с клеточными мембранными структурами, дестабилизируя мембранный потенциал. Дестабилизация клеточной стенки значительно увеличивает бактериальную про-



**Рисунок 1. Схематичное изображение основных антибактериальных механизмов действия наночастиц металла или оксида металла против бактерий**

Figure 1. Schematic illustration of general mechanisms of antibacterial action of metal and metal oxide nanoparticles

нищаемость, позволяя также и более крупным наночастицам проникать в клетку. Оказавшись внутри клетки, наночастицы и ионы взаимодействуют с многочисленными структурами и биомолекулами (белками, липидами и ДНК), что приводит к дисфункции бактериальной клетки;

3) производство активных форм кислорода (АФК). Наночастицы антибактериальных металлов и оксидов металлов хорошо известны своей высокой способностью производить АФК и свободные радикалы, такие как перекись водорода ( $H_2O_2$ ), супероксид-анион ( $O_2^-$ ) и гидроксильный радикал ( $OH\cdot$ ), вызывая повреждение почти всех органических биомолекул (аминокислот, углеводов, липидов, нуклеиновых кислот и белков), что в конечном итоге вызывает гибель микробов.

В случае наночастиц оксида металла, например ZnO, фотокаталитические свойства оказывают важное влияние на антибактериальную активность. Фотокатализ полупроводниковых наночастиц обусловлен образованием электронно-дырочных пар, которые генерируют АФК при облучении светом [45].

### Факторы, влияющие на антибактериальную активность наночастиц

Доказано, что антибактериальная активность наночастиц металлов и оксидов металлов зависит от нескольких факторов, среди которых размер, форма, концентрация, поверхностный

заряд и др. (рис. 2). Приведем описанные в литературе примеры влияния основных факторов для наночастиц серебра, меди и цинка.

**Размер наночастиц.** Наночастицы серебра меньшего размера имеют тенденцию усиливать антибактериальные свойства: частицы размером от 1 до 10 нм обладают более эффективными свойствами с точки зрения уничтожения бактерий [24, 34, 60].

Увеличение антибактериальной активности характерно также для наночастиц оксида цинка и оксида меди наименьшего размера [24]. Наночастицы ZnO с меньшим размером (например, 8 нм) при меньшей концентрации показывают более высокий процент ингибирования бактерий по сравнению с наночастицами ZnO с более крупным размером (например, 50–70 нм) при их большей концентрации. Размер наночастиц может оказывать большее влияние на их активность, вероятно, из-за большего накопления наночастиц внутри клеточной мембраны и цитоплазмы микроорганизмов [40, 72]. Другие авторы предполагают, что увеличенная антибактериальная активность может быть связана с тем, что более мелкие наночастицы ZnO высвобождают свои токсичные компоненты (например, АФК,  $Zn^{2+}$ ) с более высокой скоростью из-за увеличения поверхностно-объемного отношения при уменьшении размера частиц [24, 45].

**Форма наночастиц.** В литературе встречаются данные по исследованиям, сравнивающим влияние формы и граней наночастиц на антибактериальную активность. Установлено, что кристалли-

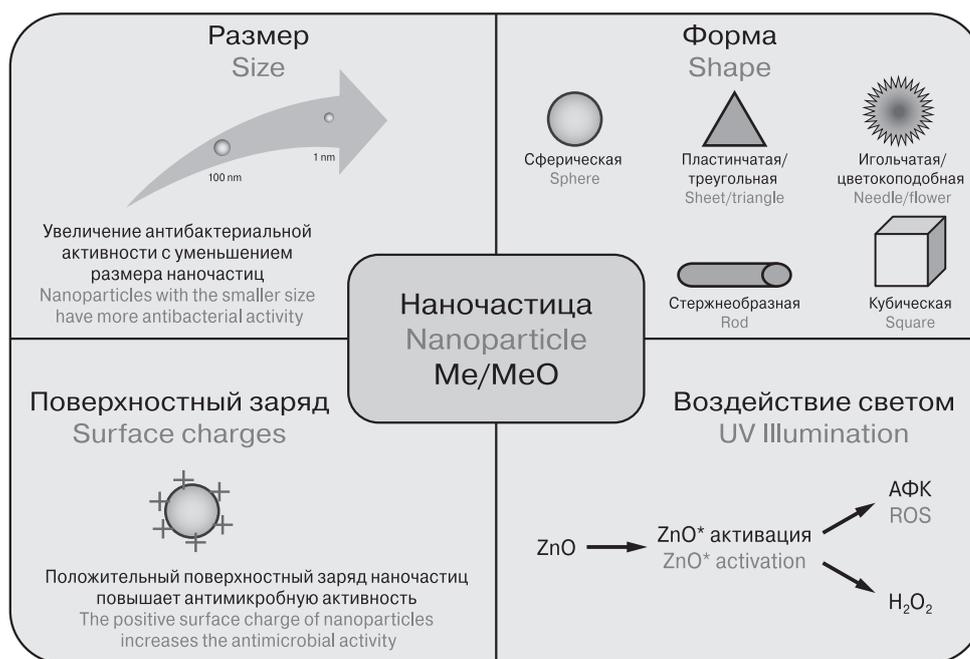


Рисунок 2. Факторы, влияющие на антибактериальные свойства наночастиц

Figure 2. Main factors of antibacterial activity of nanoparticles

ческие частицы с высокой атомной плотностью и гранью (111) обладают большей активностью против бактерий. Например, треугольные нанопластины серебра с гранями (111) имеют более высокую плотность атомов и, соответственно, обладают более высокой реакционной способностью по сравнению с наночастицами сферической и стержнеобразной формы, имеющими грани (100) и (110) и с ионами  $\text{Ag}^+$  (в форме  $\text{AgNO}_3$ ). Высокая антимикробная активность наночастиц  $\text{Ag}$  по сравнению с солями серебра обусловлена большой площадью поверхности наночастиц, что обеспечивает хороший контакт  $\text{Ag}$  с микроорганизмами [37, 64].

Наночастицы  $\text{ZnO}$  с высокой атомной плотностью и гранью (111) в форме стержня или проволоки обладают большей антибактериальной активностью, чем частицы сферической формы. Также показано, что форма цветка имеет большую биоцидную активность против *S. aureus* и *E. coli*, чем сферические и палочковидные наночастицы  $\text{ZnO}$  [45, 72].

Сравнение антибактериальной активности кубических и октаэдрических кристаллов  $\text{Cu}_2\text{O}$  показало, что октаэдрические частицы с гранями кристалла (111) проявляли большую активность, чем кубические частицы с гранью (100) кристаллической плоскости [24].

**Поверхностный заряд наночастиц.** Антимикробная активность наночастиц также может модулироваться путем контроля их поверхностного заряда. Например, было показано, что наночастицы серебра с положительным поверхностным зарядом обладают повышенной антимикробной активностью [36]. Наночастицы  $\text{ZnO}$  с положительным поверхностным потенциалом демонстрируют очень высокую антимикробную активность в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий, в то время как наночастицы  $\text{ZnO}$  того же размера, но с отрицательным поверхностным потенциалом, не проявляют какого-либо значительного ингибирования роста микроорганизмов [64].

## Стратегии по усилению антибактериального эффекта: легирование наночастиц оксидов металлов и создание нанокompозитов

Наряду с описанными ранее факторами, влияющими на антибактериальную активность наночастиц (размер, морфология и т. д.), усиленный антимикробный эффект может быть достигнут за счет модификации наночастиц легированием (допированием) или созданием нанокompозитов оксидов металлов.

Металл-оксидные нанокompозиты привлекают особое внимание, поскольку они сочета-

ют свойства составляющих их элементов и оказывают более выраженный и синергетический эффект по сравнению с одиночными оксидами [52]. Формирование нанокompозитов или же допирование металлом/неметаллом известных антибактериальных оксидов металлов позволяют снимать существующие ограничения при использовании одиночных оксидов, устранять их существующие недостатки и, соответственно, увеличивать эффективность антибактериального действия [49].

Усиленные антибактериальные свойства допированных наночастиц оксидов металлов или композитов из смесей оксидов металлов связывают со следующими факторами:

- увеличение отношения площади поверхности к объему [21, 49, 52];
- уменьшение размеров наночастиц [49];
- увеличение поверхностных дефектов [23];
- увеличение фотокаталитической активности оксидов металлов за счет уменьшения энергии запрещенной зоны при связывании с оксидом металла с меньшей шириной запрещенной зоны [22] или при легировании [45, 68].

Все эти факторы приводят к большему образованию АФК или большему выделению антибактериальных катионов.

В исследовательских работах по данной тематике преимущественно представлены двойные нанокompозиты  $\text{ZnO-CuO}$  [30, 37, 49, 56, 57, 66, 71],  $\text{Ag}_2\text{O-CuO}$  [65],  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZnO}$  [20] и другие, которые демонстрируют значительное увеличение антибактериальной активности в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий по сравнению с действием индивидуальных оксидов.

Значительное количество работ [16, 17, 18, 19, 52, 65] описывает повышенную антибактериальную активность композитов на основе оксидов  $\text{CuO}$  и  $\text{ZnO}$ , в состав которых входит серебро, а именно композитов  $\text{Ag}_2\text{O-CuO}$ ,  $\text{Ag-ZnO}$  и  $\text{Ag-CuO}$ , по сравнению с собственно  $\text{CuO}$  и  $\text{ZnO}$ . Этот усиленный эффект в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий связывают, в частности, с усилением фотокаталитической способности полупроводниковых наночастиц при допировании серебром.

Также известно, что наночастицы небольшого размера, в частности серебра, склонны к агрегации, что значительно влияет на их химические и антибактериальные свойства. Поэтому для преодоления этой проблемы используют модификацию поверхности наночастиц: например, это может быть покрытие серебра слоем оксида металла, что обеспечивает увеличение отношения площади поверхности к объему и сохраняет антибактериальную активность наночастицы.

В последние годы активно изучаются тройные наноконпозиты ZnO-MnO<sub>2</sub>-Cu<sub>2</sub>O, ZnO-Ag<sub>2</sub>O-Ag<sub>2</sub>S, ZnO-Ag-Mn<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [28, 35, 70, 83], которые также демонстрируют усиленный антибактериальный эффект.

Недавно продемонстрирована антибактериальная активность наночастиц тройного оксида (Cu-Zn-Fe) против грамотрицательных (*Escherichia coli*) и грамположительных (*Enterococcus faecalis*) бактерий. Основной целью исследования являлось объединение сильной антибактериальной активности наночастиц ZnO, CuO и Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Комбинация трех оксидов образовала новый наноструктурированный тройной оксид (триоксид Cu-Zn-Fe). Измерение оптической плотности клеток бактерий *E. coli* показало снижение плотности клеток на 55% при воздействии наночастиц ZnO и почти на 85% — при воздействии наночастиц триоксида. У бактерий *E. faecalis* наибольшее падение плотности клеток (около 59%) наблюдали при воздействии наночастиц CuO, а при действии ZnO и триоксида — на 25 и 55% соответственно. Рост бактерий и влияние наночастиц также измеряли с помощью метода диффузии в агар (модификации стандартного диско-диффузионного метода [ДДМ]). Жизнеспособность *E. faecalis* и *E. coli* снижалась на 40 и 38% соответственно в присутствии наночастиц триоксида Cu-Zn-Fe. При этом наночастицы ZnO влияли на снижение жизнеспособности клеток *E. faecalis* и *E. coli* на 22 и 75% соответственно. Наночастицы CuO почти не влияли на *E. coli*, тогда как они снижали жизнеспособность *E. faecalis* на 70%. В целом анализ гибели клеток показал, что уровень влияния наночастиц триоксида на *E. coli* и *E. faecalis* лежит между значениями эффектов наночастиц ZnO и CuO [14].

Более подробное описание примеров антибактериального эффекта наноконпозитов оксидов металлов приведено в таблице 1.

Допирование является широко используемым методом модификации наночастиц [26, 49]. Так, например, в ряде работ показано, что легирующие примеси Ag [17, 18, 19, 52], Ce [21], Cr [23], Mn [68], Nd [32], Co [58], Sn [38], Fe [67], Cu, La [15] играют важную роль в антибактериальной активности ZnO. Допирование наночастиц CuO ионами Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> и Ce<sup>4+</sup> стимулирует выделение ионов Cu<sup>2+</sup> и усиливает антибактериальное действие [46].

Авторы работы [32] синтезировали чистые ZnO и наночастицы ZnO, допированные неодимом, и провели микробиологические исследования в отношении штаммов грамотрицательных бактерий *E. coli* и *Klebsiella pneumoniae*. Испытания методом диффузии в агар подтвердили, что Nd-ZnO обладает более высокой антимикробной активностью, чем собственно

ZnO, зона ингибирования бактерий увеличена с 12 до 14 мм для бактерий *E. coli* и с 9 до 11 мм — для *K. pneumoniae*. В работе [68] также продемонстрирована повышенная антимикробная активность ZnO, легированного марганцем, по сравнению с ZnO, против *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella dysenteriae*, *S. typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *B. subtilis* и *Staphylococcus aureus*. Подобные исследования проведены в [26, 58], где повышенную антибактериальную активность ZnO, допированного кобальтом, сравнивали с ZnO. Допирование повышало эту активность. Причем антибактериальный эффект усиливается в присутствии света. В работе [48] отмечено изменение в морфологии наночастиц при допировании ZnO железом. При допировании и увеличении концентрации железа наночастицы ZnO с морфологией наночеток приобретали форму, похожую на морского ежа. Наряду с изменениями в морфологии, при допировании наблюдали усиленный антимикробный эффект в отношении штаммов грибов *Candida albicans* и *Aspergillus flavus* по сравнению с ZnO. Степень ингибирования этих микроорганизмов после взаимодействия с допированными образцами составила 94 и 81% соответственно, для нелегированных образцов ZnO эти значения составили 60 и 66% соответственно.

Авторы работ [50, 73] получили покрытие из наночастиц CuO, допированных Zn (Zn<sub>0.12</sub>Cu<sub>0.88</sub>O), которые служили антибиопленочными и биосовместимыми покрытиями для медицинских катетеров. Несмотря на то что на катетер нанесена относительно низкая концентрация наночастиц CuO, легированных Zn (0,046 мас.%), этого количества достаточно для достижения эффективной антибиопленочной активности против трех распространенных патогенных микроорганизмов мочевыводящих путей: *E. coli*, *S. aureus* и *Proteus mirabilis*. Рост микробных биопленок *E. coli*, *S. aureus* и *P. mirabilis* на катетерах, покрытых допированной оксидной пленкой, был на 91, 92 и 99,5% соответственно ниже, чем в катетерах без покрытия. Антибактериальная/антибиопленочная активность, связанная с наночастицами CuO, допированными Zn, объясняется изменениями в атомном составе моноклинной решетки CuO, что вызывает структурные дефекты, которые, в свою очередь, способствуют образованию более высокой концентрации АФК, что делает допированный наноконпозит гораздо более эффективным в качестве антимикробного/антибиопленочного агента.

Другие примеры работ в этой области рассмотрены в таблице 2.

Недавние исследования показали, что допирование неметаллами (например, C, N, F, S) уменьшает ширину запрещенной зоны в раз-

Таблица 1. Наноконпозиты оксидов металлов и их антибактериальный эффект

Table 1. Antibacterial effect of nanocomposites based on metal oxides

Состав Composition	Средний размер и форма наночастиц Average size and shape of nanoparticles	Метод изготовления Methods of synthesis	Антибактериальный эффект Antibacterial effect	Источник References
ZnO-CuO	От 13 до 40 нм, сферическая и гексагональная 13–40 nm, spherical and hexagonal	<b>Методы соосаждения, сжигания в растворе, пиролиз, гидротермальный</b> Co-precipitation, solution combustion synthesis, pyrolysis, hydrothermal synthesis	<b>Увеличение антибактериальной активности против Грам(+) (<i>S. epidermidis</i>, <i>S. aureus</i>) и Грам(-) (<i>E. coli</i>, <i>P. aeruginosa</i>, <i>P. mirabilis</i>) по сравнению с ZnO</b> Antibacterial activity was increased against Gram-positive bacteria ( <i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> ) and Gram-negative ( <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. mirabilis</i> ) compared with ZnO	[56, 57, 66, 71]
Ag <sub>2</sub> O-CuO	15–30 нм, нанопластины и наностержни 15–30 nm, nanoplates and nanorods	<b>Осаждение из водных растворов под микроволновым воздействием</b> Microwave-assisted precipitation from aqueous solutions	<b>Активен против Грам(-) (<i>E. coli</i>)</b> Antibacterial activity against Gram-negative bacteria ( <i>E. coli</i> )	[65]
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -ZnO	27 нм, сферическая 27 nm, spherical	<b>Золь-гель метод</b> Sol-gel method	<b>Улучшенные антимикробные свойства наночастиц против Грам(+) (<i>S. aureus</i>, <i>B. subtilis</i>) и Грам(-) (<i>E. coli</i>)</b> Antimicrobial activity was increased against Gram-positive ( <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> ) and Gram-negative bacteria ( <i>E. coli</i> )	[20]
ZnO-MnO <sub>2</sub> - Cu <sub>2</sub> O	До 100 нм, кубическая, сферическая Up to 100 nm, cubic, spherical	<b>Осаждение из растворов центрифугированием</b> Precipitation from aqueous solutions by centrifugation	<b>Увеличение антибактериальной активности по сравнению с ZnO и ZnO- MnO<sub>2</sub> против Грам(+) (<i>S. aureus</i>) и Грам(-) (<i>E. coli</i>) на 100 и 50% соответственно. Измерение зоны ингибирования ДДМ</b> Antimicrobial activity of ZnO and ZnO-MnO <sub>2</sub> against Gram-positive ( <i>S. aureus</i> ) and Gram- negative bacteria ( <i>E. coli</i> ) was increased by ~100% and 50% respectively. Antibacterial activity was measured by agar disc diffusion method	[35]
ZnO-Ag <sub>2</sub> O- Ag <sub>2</sub> S	~23 нм, нанопластины ~23 nm, nanoplates	<b>Наночастицы ZnO – сонохимический метод; осаждение Ag<sub>2</sub>O – погружение в золь под УФО; осаждение Ag<sub>2</sub>S- SILAR метод</b> ZnO NPs were synthesized by the sonochemical method; deposition of Ag <sub>2</sub> O on ZnO NPs under UV irradiation; deposition of Ag <sub>2</sub> S by SILAR method	<b>Увеличение антибактериальной активности на 100% против Грам(+) (<i>B. subtilis</i>) и Грам(-) (<i>E. coli</i>) по сравнению с ZnO (увеличение зоны ингибирования с 17 до ~30 мм)</b> Antimicrobial activity of ZnO against Gram- positive ( <i>B. subtilis</i> ) and Gram-negative bacteria ( <i>E. coli</i> ) was increased by ~100% (inhibition zone increased from 17 mm to ~30 mm)	[83]
ZnO-Ag- Mn <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	150–200 нм, наностержни 150–200 nm, nanorods	<b>Термическое разложение</b> Thermal decomposition method	<b>Увеличение антибактериальной активности против Грам(+) (<i>S. aureus</i>) (увеличение зоны ингибирования с 13 до 22 мм) и Грам(-) (<i>E. coli</i>) (увеличение зоны ингибирования с 10 до 25 мм) по сравнению с чистым ZnO</b> Antibacterial activity of ZnO against Gram- positive ( <i>S. aureus</i> ) and Gram-negative bacteria ( <i>E. coli</i> ) was increased. Inhibition zone increased from 13 to 33 mm and from 10 to 25 mm respectively.	[70]

## Окончание таблицы 1. Наноконпозиты оксидов металлов и их антибактериальный эффект

Table 1. Antibacterial effect of nanocomposites based on metal oxides (continued)

Состав Composition	Средний размер и форма наночастиц Average size and shape of nanoparticles	Метод изготовления Methods of synthesis	Антибактериальный эффект Antibacterial effect	Источник References
Триоксид Cu-Zn-Fe Trimetal (Cu-Zn-Fe) oxide	23 нм, сферическая 23 nm, spherical	Осаждение из растворов с использованием кипячения с обратным холодильником и последующим центрифугированием Precipitation from solutions by using reflux and centrifugation	Уровень влияния наночастиц триоксида на <i>E. coli</i> и <i>E. faecalis</i> лежит между значениями эффектов наночастиц ZnO и CuO. Измерение зоны ингибирования ДДМ и оптической плотности клеток Antibacterial effect of Cu-Zn-Fe oxide NPs against <i>E. coli</i> и <i>E. faecalis</i> was between the ZnO and CuO NPs. Antibacterial activity was defined by measure of the inhibition zone by disc diffusion method and optical density	[14]
F-ZnO-CuO	~100 нм, квадратная ~100 nm, nanosquare	Соосаждение Co-precipitation	Увеличение антибактериальной активности против Грам(+) ( <i>S. mutans</i> ) по сравнению с композитом ZnO-CuO Antibacterial activity of the ZnO-CuO nanocomposite against Gram-positive ( <i>S. mutans</i> ) bacteria was increased	[53]

личных оксидах металлов, что способствует увеличению антибактериальной активности [31, 53]. Показано, что N-допированный ZnO демонстрирует повышенную биологическую активность в отношении *E. coli* [31]. Авторы работы [61] обнаружили, что F-допированный ZnO эффективен в отношении *S. aureus* и *E. coli* при облучении видимым светом, потому что допирование увеличило выработку АФК.

### Пролонгация бактерицидных свойств за счет создания наноконпозитов на базе многокомпонентных оксидов

Одной из существующих проблем использования антимикробных неорганических материалов является быстрое и неконтролируемое высвобождение наночастиц и ионов. Внезапное высвобождение антибактериальных агентов затрудняет долгосрочное применение, увеличивает их цитотоксичность. Ряд исследований в эксперименте *in vivo* показал, что цитотоксические эффекты зависели от размера, концентрации и времени воздействия. Стабильность бактерицидных материалов имеет решающее значение для их клинического применения [27, 43, 44].

Для достижения долгосрочного и контролируемого высвобождения антибактериальных агентов в последние годы активно изучают вопросы разработки наноконпозитов на основе наночастиц металлов/оксидов металлов в сочетании с органическими или неорганическими материалами со специальной структурой.

Благодаря своей уникальной двухмерной слоистой структуре, большой удельной поверх-

ности и хорошей биосовместимости графен широко используется во многих областях, включая биомедицину. Исследования показывают, что загрузка наночастиц серебра в графен или его производные может эффективно предотвращать их агрегацию и улучшать стабильность материалов в физиологических растворах, и, следовательно, позволяет максимально проявлять их антибактериальный эффект [43, 82].

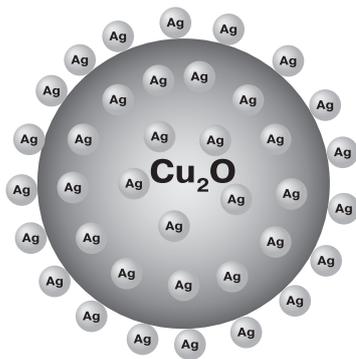
Авторы работы [43] использовали восстановленный оксид графена (rGO), дисульфид молибдена ( $\text{MoS}_2$ ) и нитрат серебра ( $\text{AgNO}_3$ ) для синтеза тройного наноконпозита rGO-MoS<sub>2</sub>-Ag. Полученный материал имел структуру «смятого» листа с адсорбированными наночастицами серебра и проявлял улучшенные антибактериальные свойства в отношении бактерий *E. coli* и *S. aureus* по сравнению с одиночными компонентами композита. При этом при погружении наноконпозита в физиологический раствор на несколько дней зафиксирована задержка высвобождения ионов  $\text{Ag}^+$ , что свидетельствует о длительном антибактериальном действии rGO-MoS<sub>2</sub>-Ag.

Описанный в работе [82] наноконпозит GO-PEG-Ag, состоящий из оксида графена и полиэтиленгликоля (PEG) с загруженными наночастицами серебра, продемонстрировал повышенную антибактериальную активность, стабильность в физиологических средах и меньшую цитотоксичность в отношении эукариотических клеток по сравнению с композитом GO-Ag при равном содержании серебра. Синергетический эффект от трех составляющих наноконпозита GO-PEG-Ag проявляется следующим образом: наночастицы Ag выступают основным антибактериальным компо-

Таблица 2. Антибактериальный эффект допированного оксида ZnO

Table 2. Antibacterial effect of the metal and nonmetal doped ZnO

Легирующая добавка Doping element	Средний размер и форма наночастиц Average size and shape of nanoparticles	Антибактериальный эффект Antibacterial effect	Источник References
Ag	До 100 нм, сферическая Up to 100 nm, spherical	Активен против Грам(+) ( <i>S. aureus</i> ) и Грам(–) ( <i>E. coli</i> ) Strong antibacterial effect against Gram-positive ( <i>S. aureus</i> ) and Gram-negative bacteria ( <i>E. coli</i> )	[17, 18, 19, 52]
Ce	До 100 нм, сферическая Up to 100 nm, spherical	Обладает эффективными антибактериальными свойствами против Грам(+) ( <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> ): зона ингибирования увеличена с 0 до 7 мм для обоих типов бактерий и Грам(–) ( <i>P. mirabilis</i> , <i>S. Typhi</i> ), увеличение зоны ингибирования с 12 до 18 мм и 27 мм соответственно по сравнению с наночастицами ZnO Strong antimicrobial effect against Gram-positive ( <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> ): inhibition zone increased from 0 mm to 7 mm, and Gram-negative bacteria ( <i>P. mirabilis</i> , <i>S. Typhi</i> ): inhibition zone increased from 11 mm to 18 and 27 mm respectively, compared with ZnO NPs	[21]
Cr	31 нм, пористая структура 31 nm, pore structure	Усиленные антибактериальные свойства против Грам(+) ( <i>B. subtilis</i> ) и Грам(–) ( <i>E. coli</i> ) по сравнению с ZnO Strong antimicrobial effect against Gram-positive ( <i>B. subtilis</i> ) and Gram-negative bacteria ( <i>E. coli</i> ) compared with ZnO NPs	[23]
Mn	17 нм 17 nm	Обладает эффективными антибактериальными свойствами против Грам(+) и Грам(–) ( <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. dysenteriae</i> , <i>S. Typhi</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> ) по сравнению с наночастицами ZnO Strong antimicrobial effect against Gram-positive and Gram-negative bacteria ( <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. dysenteriae</i> , <i>S. Typhi</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> ) compared with ZnO NPs	[68]
Co	25 нм, игольчатые и стержнеобразные зерна 25 nm, needle and seed like	Обладает эффективными антибактериальными свойствами против Грам(+) и Грам(–) ( <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. dysenteriae</i> , <i>S. Typhi</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> ) по сравнению с наночастицами ZnO Strong antimicrobial effect against Gram-positive and Gram-negative bacteria ( <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. dysenteriae</i> , <i>S. Typhi</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> ) compared with ZnO NPs	[26, 51, 58]
Nd	33 нм, наночеток 33 nm, nanoflower	Обладает эффективными антибактериальными свойствами против Грам(–) ( <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> ) по сравнению с наночастицами ZnO (зона ингибирования бактерий была увеличена с 12 до 14 мм для бактерий <i>E. coli</i> и с 9 до 11 мм для <i>K. pneumoniae</i> ) Strong antimicrobial effect against Gram-negative bacteria ( <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> ) compared with ZnO NPs (Inhibition zone increased from 12 to 14 mm for <i>E. coli</i> and from 9 to 11 mm for <i>K. pneumoniae</i> )	[32]
Sn	32, 36 нм, наностержни 32, 36 nm, nanorods	Усиленные антибактериальные свойства против <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> по сравнению с ZnO. Зона ингибирования увеличена почти на 37% (с 14 до 22 мм) Strong antimicrobial effect <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> compared with ZnONPs. Inhibition zone increased by ~37% (from 14 to 22 mm)	[38]
Fe	Структура «морского ежа» Urchin-like structure	Усиленный антибактериальный эффект против <i>C. albicans</i> , <i>A. flavus</i> по сравнению с ZnO Strong antimicrobial effect against <i>C. albicans</i> , <i>A. flavus</i> compared with ZnO NPs	[67]
La, Cu	20–35 нм, наностержни 20–35 nm, nanorods	Усиленная антибактериальная эффективность против Грам(+) ( <i>S. aureus</i> ) и Грам(–) ( <i>P. aeruginosa</i> ) Strong antimicrobial effect against Gram-positive ( <i>S. aureus</i> ) and Gram-negative bacteria ( <i>P. aeruginosa</i> )	[15]



**Рисунок 3. Схематичное изображение структуры нанокompозита  $\text{Cu}_2\text{O}$ -Ag**

Figure 3. Schematic illustration of the  $\text{Cu}_2\text{O}$ -Ag nanocomposite

нением системы, GO предотвращает агрегацию наночастиц Ag, PEG усиливает дисперсию композита и эффективность контакта между нанокompозитом и микробной клеткой, предотвращает токсическое воздействие комплекса на эукариотическую клетку. Нанокompозит GO-PEG-Ag проявлял длительную антибактериальную эффективность, сохраняя 95% антибактериальной активности после недельного хранения в физиологическом растворе по сравнению с менее чем 35% для композита GO-Ag.

Низкая скорость высвобождения ионов  $\text{Ag}^+$  из нанокompозита Ag- $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -GO продемонстрирована авторами работы [29]. Нанокompозит Ag- $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -GO показал улучшенные долгосрочные антибактериальные свойства в отношении *E. coli* и *B. subtilis* по сравнению с отдельными наночастицами Ag и Ag- $\text{Fe}_2\text{O}_3$ . Бактерицидная активность действия нанокompозита сохранялась до 19 дней. В дополнение к этому по итогам оценки длительности антибактериального действия обнаружено, что наноленты GO содержали рекристаллизованные наночастицы серебра, в то время как на образцах Ag- $\text{Fe}_2\text{O}_3$  такого эффекта не наблюдалось. Ионы  $\text{Ag}^+$ , высвобождаемые из наночастиц серебра, вероятно, снова восстанавливаются мягкими восстановителями в растворе или с помощью фотохимического процесса, образуя наночастицы Ag на поверхности GO. Это указывает на то, что кроме замедления окисления наночастиц Ag до  $\text{Ag}^+$  оксид графена также может служить местом образования наночастиц серебра, что еще больше снижает высвобождение ионов  $\text{Ag}^+$  в окружающую среду и способствует пролонгированному антибактериальному действию при сохранении его выраженности.

В работах [62, 78] сообщается о долгосрочном антибактериальном эффекте нанокompозитов на основе восстановленного оксида графена (rGO) и оксида меди ( $\text{CuO}$  или  $\text{Cu}_2\text{O}$ ).

rGO является защитным барьером для оксида меди, снижая скорость выделения ионов меди, а также препятствует агрегации и способствует равномерному диспергированию оксида меди. Синергетический эффект замедленного высвобождения ионов меди, повышенная способность к производству АФК и равномерное диспергирование нанокompозита приводят к выраженной антимикробной активности этого материала против *E. coli* и *S. aureus* по сравнению с собственно оксидом меди после погружения в физиологический раствор. Бактерицидная активность действия нанокompозита сохранялась до 30 дней.

Недавно авторами работ [47, 79] приведены результаты микробиологического теста синтезированного гибрида оксида меди и серебра ( $\text{Cu}_2\text{O}$ -Ag). Композитные микросферы  $\text{Cu}_2\text{O}$ -Ag продемонстрировали необычайную длительную антибактериальную способность против *S. aureus* и *P. aeruginosa* по сравнению с  $\text{Cu}_2\text{O}$ . Бактерицидная активность против этих бактерий сохранялась на уровне около 70 и 80% соответственно, а также была увеличена на 40 и 50% соответственно по сравнению с  $\text{Cu}_2\text{O}$  после погружения в фосфатный буферный раствор (PBS) в течение 14 дней. Микросферы могли сохранять длительное и плавное выделение  $\text{Cu}^{2+}$ , главным образом благодаря тому, что наночастицы Ag равномерно распределены на поверхности сферического  $\text{Cu}_2\text{O}$ , плотно обертывая его и формируя защитный барьер, таким образом уменьшая возможность контакта  $\text{Cu}_2\text{O}$  с внешним раствором (рис. 3). Кроме того, наночастицы Ag, загруженные на поверхность частиц  $\text{Cu}_2\text{O}$ , образуют большое количество каналов для высвобождения ионов, что приводит к длительному выделению  $\text{Cu}^{2+}$ . Благодаря синергетическому эффекту наночастиц Ag и  $\text{Cu}_2\text{O}$  также наблюдалась повышенная способность выделения АФК, что усиливало антибактериальный эффект композита по сравнению с чистым оксидом меди.

Ряд авторов изучали контролируемое выделение антибактериальных ионов с применением нанотрубок оксида титана, имеющим полую трубчатую структуру, в качестве наноконтейнеров для хранения антимикробных агентов [54, 75, 80]. Загруженные ионами или наночастицами серебра или же оксида цинка, нанотрубки  $\text{TiO}_2$  демонстрировали их длительное устойчивое выделение, а также усиление антибактериальной активности. Благодаря этим свойствам, а также биосовместимости, такие системы рассматривают в качестве перспективного бактерицидного материала для имплантатов.

Многочисленные исследования показали, что включение наночастиц Ag, ZnO, CuO,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  в ряд полимерных соединений, в том

числе хитозан, целлюлозу, усиливает антимикробные свойства материалов, а также способствует более длительному высвобождению антибактериальных агентов [25, 55, 59, 76]. Среди них, например, наночастицы серебра, закрепленные на биосовместимой нанофибриллированной целлюлозе (NFC) [42], мембраны из бактериальной целлюлозы, нагруженные наночастицами меди или оксида цинка [33, 39], гибридное покрытие гидроксипатит/хитозан/серебро на поверхности титанового имплантата [77], наночастицы Ag-ZnO с триблок-сополимерами PEG-PHBV-PEG [81], полиметилметакрилат/высокомолекулярный поливинилпирролидон/наночастицы серебра [1, 7]. В количественном чашечно-суспензионном тесте показано снижение уровня микробной популяции чувствительного и резистентного к гентамицину изолятов *S. epidermidis* на  $3\log_{10}$  в вытяжках из костного цемента с нанокластерами серебра (антисептик повииаргол) на 292 день эксперимента [1], тогда как стандартный костный цемент с гентамицином оказывает антимикробный эффект не более 56 дней [10], что свидетельствует об эффективности наночастиц серебра в отношении антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов и о пролонгации этого эффекта в присутствии полимера поливинилпирролидона. Известно, что эффективные антисептики должны снижать уровень микробной популяции не менее чем на  $2\log_{10}$  [41]. При дополнительном введении в костный цемент с гентамицином, поливинилпирролидоном, повииарголом еще одного антисептика из группы оксихинолинов, диоксидина, наблюдали усиление указанных эффектов [7].

Разработана и внедрена в клиническую практику лавсановая сетка для герниопластики. Для придания протезу антимикробных свойств на сетку наносили покрытие, представляющее собой металл-полимерный композит, состоящий из высокодисперсного серебра, стабилизированного низкомолекулярным поливинилпирролидоном (антисептиком повииарголом), и поливинилпирролидона высокомолекулярного. Концентрация повииаргола 1% на  $1\text{ см}^2$  сетки способствовала высокой бактерицидной активности протеза для герниопластики в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Особого внимания заслуживают данные о предотвращении формирования микробной биопленки золотистого стафилококка в опытах на морских свинках, которым сетчатый протез размещали подкожно в условиях контаминации штаммом *S. aureus* 209P Оксфорд. На контрольной сетке без нанесения покрытия с наночастицами серебра через

24 часа обнаруживали биопленки стафилококка в количестве  $10^3$  КОЕ/см<sup>2</sup>, на 3 день —  $10^6$  КОЕ/см<sup>2</sup>, на 5 день —  $10^9$  КОЕ/см<sup>2</sup>, что подтверждено методом электронной сканирующей микроскопии. Образцы лавсановой сетки с повииарголом оказались стерильны, при исследовании методом диффузии в агар обладали собственной антимикробной активностью в отношении используемого тест-штамма *S. aureus* [9].

Придание стабильности наноматериалам во многих случаях достигается использованием композитов, когда наночастицы серебра, меди, цинка и их соединений находятся в порах или на поверхности кремнеземных матриц. Для таких целей применяют природные и синтетические кремнеземные материалы. Композиты на основе монтмориллонитов, диатомитов, цеолитов, а также SBA-15, модифицированные серебром, медью и цинком, используются для наполнения полимеров и придания им бактерицидных свойств [3]. Особый интерес вызывают нанокompозиты на основе синтетических и природных полимеров с серебром, медью, оксидом цинка, оксидом меди, селеном, обладающие низкой токсичностью и выраженными антимикробными и ранозаживляющими свойствами [11].

Известны положительные свойства белков и полисахаридов в лечении ран: создание среды для заживления (альгинаты и хитозаны) и образование матрицы для роста новообразованной грануляционной ткани (коллаген), при этом такие полимерные структуры могут использоваться как депо для направленной доставки лекарственных препаратов [8]. Отечественный гидрогель-клей хирургический антисептический «Аргакол» содержит в своем составе альгинат натрия, коллаген и четыре антисептика с различными механизмами антимикробного действия: нанокластеры серебра (повииаргол), гипохлорит натрия, диоксидин (гидроксиметилхиноксалиндиоксид), бензалконий хлорид (четвертично-аммониевое соединение). В количественном чашечно-суспензионном тесте показано, что при экспозиции 60 мин препарат снижает уровень микробной популяции на  $4-5\log_{10}$  в отношении тест-штаммов *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 15442, *C. albicans* ATCC 10231. Эффективность антимикробного действия «Аргакола» подтверждена в многочисленных клинических исследованиях, в том числе в отношении антибиотикорезистентных изолятов возбудителей гнойно-септических осложнений, а соотношение биополимеров (альгината натрия и коллагена) в препарате обеспечивает регулируемую скорость высвобождения биологически активных веществ и биодеградации гидрогеля, что способствует ускорению заживления ран [2].

## Заключение

Разработка эффективных антибактериальных соединений является одной из приоритетных областей в современной медицине. Вследствие развития резистентности микроорганизмов к антибиотикам, соединения на основе металлических или металл-оксидных наночастиц (серебро, оксид меди, оксид цинка, оксид железа) рассматриваются в качестве перспективных антимикробных материалов, так как, прежде всего, позволяют избежать развития устойчивости микробов.

Работы по созданию материалов на базе металлических и металл-оксидных наночастиц и изучению их антимикробной активности ведутся исследователями во всем мире по нескольким направлениям. Во-первых, известно, что на антибактериальную активность влияет ряд факторов, таких как размер, морфология, концентрация, поверхностный заряд частиц и др. Контролируя эти параметры, можно достигать более эффективного антимикробного воздействия получаемых материалов. Во-вторых, обнаружено, что наночастицы оксидов металлов, допированные различными ионами, или композиты, состоящие из двух/трех оксидов металлов, обладают усиленными антимикробными свойствами по сравнению с их одиночными составляющими. В-третьих, крайне актуальными исследованиями в данной области являются работы, связанные с созданием стабильных антибактериальных систем и устранением проблем, ограничивающих применение неорганических наночастиц в клинической практике.

Быстрый и неконтролируемый выход ионов и наночастиц из комплексов приводит к чрезмерной локальной цитотоксичности в отношении эукариотических клеток вследствие внезапного выделения большого количества антибактериальных агентов и, соответственно, к кратковременному бактерицидному действию материала. Для устранения этих проблем разрабатывают композиты со специальной структурой, в том числе в сочетании со вспомогательными материалами как неорганическими (оксид графена, нанотрубки оксида титана, поливинилпирролидон), так и органическими (хитозан, целлюлоза, коллаген, альгинат натрия и т. д.).

Получение материалов, которые обладают пролонгированным антибактериальным, ранозаживляющим действием и низкой токсичностью, остается актуальной задачей применения в медицине и ветеринарии и является предметом дальнейших исследований в этой области.

Использование наноразмерных систем может решать одновременно несколько важных практических задач, таких как сохранение высокой пролонгированной антимикробной активности при одновременном снижении количества используемых соединений, создание новых технологий производства антимикробных препаратов с низкой токсичностью, уменьшенной экологической нагрузкой на окружающую среду, придание эффективной антимикробной защиты изделиям медицинского назначения, разработка новых биоцидных материалов, в том числе в отношении антибиотикорезистентных микроорганизмов.

## Список литературы/References

1. Афиногенова А.Г., Квиникадзе Г.Э., Спиридонова А.А., Афиногенов Г.Е., Линник С.А., Мадай Д.Ю. Микробиологическое обоснование создания композиции на основе костного цемента с пролонгированным антимикробным действием в отношении гентамицин-устойчивых *Staphylococcus epidermidis* // Проблемы медицинской микологии. 2018. Т. 20, № 4. С. 49–54. [Afinogenova A.G., Kvinikadze G.E., Spiridonova A.A., Afinogenov G.E., Linnik S.A., Maday D.Yu. Microbiological evaluation of the compositions based on bone cement with prolonged antimicrobial action against gentamicin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Problemy meditsinskoi mikologii = Problems in Medical Mycology*, vol. 20, no. 4, pp. 49–54. (In Russ.)]
2. Афиногенов Г.Е., Афиногенова А.Г., Мадай Д.Ю., Крылов К.М., Крылов П.К., Биктиниров Е.Е., Мадай О.Д. Современные антисептические гидрогели в лечении инфекционных осложнений ран в хирургии // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. 2016. Т. 175, № 3. С. 26–31. [Afinogenov G. E., Afinogenova A.G., Maday D. Yu., Krylov K.M., Krylov P.K., Biktinirov E.E., Maday O.D. Modern antiseptic hydrogel in treatment of infectious complications of wounds in surgery. *Vestnik khirurgii im. I.I. Grekova = Grekov's Bulletin of Surgery*, 2016, vol. 175, no. 3, pp. 26–31. (In Russ.)]
3. Богатырев В.М., Оранская Е.И., Галабурда М.В., Герашенко И.И., Осолодченко Т.П., Юсыпчук В.И. Кремнеземные нанокompозиты с соединениями серебра, меди, цинка и их антимикробные свойства // Химия, физика и технология поверхностей. 2016. Т. 7, № 1. С. 44–58. [Bogatyrev V.M., Oranska O.I., Galaburda M.V., Gerashchenko I.I., Osolodchenko T.P., Yusypchuk V.I. Silica nanocomposites doped with silver, copper, or zinc compound and their antimicrobial properties. *Khimiya, fizika i tekhnologiya poverkhnostei = Chemistry, Physics and Technology of Surface*. 2016. vol. 7, no. 1, pp. 44–58. (In Russ.)]
4. Егорова С.А., Кулешов К.В., Кафтырева Л.А., Матвеева З.Н. Чувствительность к антибиотикам, механизмы резистентности и филогенетическая структура популяции *S. Typhi*, выделенных в 2005–2018 гг. в Российской Федерации // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 1. С. 99–110. [Egorova S.A., Kuleshov K.V., Kaftyreva L.A., Matveeva Z.N. The antimicrobial susceptibility, resistance mechanisms and phylogenetic structure of *S. Typhi* isolated in 2005–2018 in the Russian Federation. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 99–110. doi: 10.15789/10.15789/2220-7619-ASM-1171 (In Russ.)]
5. Козлова Н.С., Баранцевич Н.Е., Баранцевич Е.П. Чувствительность к антибиотикам *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в многопрофильном стационаре // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 1, С. 79–84. [Kozlova N.S., Barantsevich N.E., Barantsevich E.P. Sensitivity to antibiotics of *Klebsiella pneumoniae* isolated in a multi-professional station. *Infektsiya i immunitet*. 2018. T. 8, № 1, C. 79–84. (In Russ.)]

- vich N.E., Barantsevich E.P. Susceptibility to antibiotics in *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in a multidisciplinary medical centre. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2018, vol. 8, no. 1, pp. 79–84. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-79-84 (In Russ.)
6. Леонтьев В.К., Кузнецов Д.В., Фролов Г.А., Погорельский И.П., Латута Н.В., Карасенков Я.Н. Антибактериальные эффекты наночастиц металлов // Российский стоматологический журнал. 2017. Т. 21, № 6. С. 304–307. [Leont'ev V.K., Kuznetsov D.V., Frolov G.A., Pogorelskiy I.P., Latuta N.V., Krasenkov Ya.N. Antibacterial effects of nanoparticles of metals. *Rossiyskii stomatologicheskii zhurnal = Russian Dental Journal*, 2017, vol. 21, no. 6, pp. 304–307. doi: 10.18821/1728-2802-2017-21-6-304-307 (In Russ.)]
  7. Линник С.А., Квиникадзе Г.Э., Кравцов Д.В., Афиногенов Г.Е., Афиногенова А.Г., Спиридонова А.А., Кучеев И.О., Ромашов П.П., Сабаев Д.А., Цололо Я.Б. Обоснование выбора спейсера при лечении поздней перипротезной инфекции области тазобедренного сустава // Профилактическая и клиническая медицина. 2019. Т. 72, № 3. С. 79–84. [Linnik S.A., Kvinikadze G.E., Kravcov D.V., Afinogenov G.E., Afinogenova A.G., Spiridonova A.A., Kucheev I.O., Romashov P.P., Sabaev D.A. Use of spacer to treat the late periprosthetic infection of hip joint. *Profilakticheskaya i klinicheskaya meditsina = Preventive and clinical medicine*, 2019, vol. 72, no. 3, pp. 79–84. (In Russ.)]
  8. Постнов В.Н., Наумышева Е.Б., Королев Д.В. Галагудза М.М. Наноразмерные носители для доставки лекарственных препаратов // Биотехносфера. 2013. № 6 (30). С. 16–27. [Postnov V.N., Naumysheva E.B., Korolev D.V. Galagudza M.M. Nanoscale carriers for drug delivery. *Biotehnosfera = Biotechnosphere*, 2013, no. 6 (30). pp. 16–27. (In Russ.)]
  9. Пострелов Н.А., Афиногенов Г.Е., Афиногенова А.Г., Басин Б.Я., Кольцов А.И., Ключев А.Н. Обоснование клинического применения протеза сетчатого для герниопластики с антимикробными свойствами (Герниопротез сетчатый с антимикробными свойствами) // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. 2009. Т. 168, № 6. С. 21–24. [Postrelov N.A., Afinogenov G.E., Basin B.Ya., Afinogenova A.G., Koltsov A.I., Kluev A.N. Substantiation of clinical application for hernioplasty of reticulate prosthesis with antimicrobial properties. *Vestnik khirurgii im. I.I. Grekova = Grekov's Bulletin of Surgery*. 2009. vol. 168, no. 6, pp. 21–24. (In Russ.)]
  10. Привольнев В.В., Родин А.В., Каракулина Е.В. Местное применение антибиотиков в лечении инфекций костной ткани // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2012. Т. 14, № 2. С. 118–131. [Privolnev V.V., Rodin A.V., Karakulina E.V. Topical use of antimicrobial agents in the treatment of bone infections. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2012, vol. 14, no. 2, pp. 118–131. (In Russ.)]
  11. Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г. Перспективы применения наночастиц металлов для целей регенеративной медицины // Сибирское медицинское обозрение. 2018. Т. 4. С. 31–37. [Shurygina I.A., Shurygin M.G. Perspectives of metal nanoparticles application for the purposes of regenerative medicine. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie = Siberian Medical Review*, 2018, vol. 4, pp. 31–37. doi: 10.20333/2500136-2018-4-31-37 (In Russ.)]
  12. Abo-zeid Y., Williams G.R. The potential anti-infective applications of metaloxide nanoparticles: a systematic review. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, 2019, vol. 12, no. 3, pp. 1–36. doi: 10.1002/wnan.1592
  13. Alavi M., Rai M. Recent advances in antibacterial applications of metal nanoparticles (MNPs) and metal nanocomposites (MNCs) against multidrug resistant (MDR) bacteria. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.*, 2019, vol. 17, no. 6, pp. 419–428. doi: 10.1080/14787210.2019.1614914
  14. Alzahrani K.E., Niazy A.A., Alswieleh A.M., Wahab R., El-Toni A.M., Alghamdi H.S. Antibacterial activity of trimetal (CuZnFe) oxide nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine*, 2018, vol. 13, pp. 77–87. doi: 10.2147/IJN.S154218
  15. Anitha S., Muthukumar S. Structural, optical and antibacterial investigation of La, Cu dual doped ZnO nanoparticles prepared by co-precipitation method. *Mater. Sci. Eng. C.*, 2019, no. 108: 110387. doi: 10.1016/j.msec.2019.110387
  16. Babu A.T., Antony R. Green synthesis of silver doped nano metal oxides of zinc & copper for antibacterial properties, adsorption, catalytic hydrogenation & photodegradation of aromatics. *J. Environ. Chem. Eng.*, 2019, vol. 7, no. 1: 102840. doi: 10.1016/j.jece.2018.102840
  17. Bazant P., Kuřitka I., Münster L., Machovsky M., Kozakova Z., Saha P. Hybrid nanostructured Ag/ZnO decorated powder cellulose fillers for medical plastics with enhanced surface antibacterial activity. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2014, vol. 25, no. 11, pp. 2501–2512. doi: 10.1007/s10856-014-5274-5
  18. Bazant P., Kuřitka I., Münster L., Kalina L. Microwave solvothermal decoration of the cellulose surface by nanostructured hybrid Ag/ZnO particles: a joint XPS, XRD and SEM study. *Cellulose*, 2015, vol. 22, no. 2, pp. 1275–1293 doi: 10.1007/s10570-015-0561-y
  19. Bazant P., Münster L., Machovsky M., Sedlak J., Pastorek M., Kozakova Z., Kuřitka I. Wood flour modified by hierarchical Ag/ZnO as potential filler for wood–plastic composites with enhanced surface antibacterial performance. *Ind. Crops. Prod.* 2014, vol. 62, pp. 179–187. doi: 10.1016/j.indcrop.2014.08.028
  20. Bahari A., Roeinfard M., Ramzannezhad A., Khodabakhshi M., Mohseni M. Nanostructured features and antimicrobial properties of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/ZnO Nanocomposites. *Natl. Acad. Sci. Lett.*, 2018, vol. 42, pp. 9–12. doi: 10.1007/s40009-018-0666-6
  21. Bomila R., Srinivasan S., Venkatesan A., Bharath B., Perinbam K. Structural, optical and antibacterial activity studies of Ce-doped ZnO nanoparticles prepared by wet-chemical method. *Mat. Res. Innov.*, 2018, vol. 22, no. 7, pp. 379–386. doi: 10.1080/14328917.2017.1324379
  22. Bonilla-Gameros L., Chevallier P., Sarkissian A., Mantovani D. Silver-based antibacterial strategies for healthcare-associated infections: processes, challenges, and regulations. An integrated review. *Nanomedicine*, 2020, vol. 24: 102142. doi: 10.1016/j.nano.2019.102142
  23. Choi Y., Kim K.M., Jang Y. Jeong H., Singh V., Rangarajulu S.K. Investigations on the ZnO- and Cr-doped ZnO powders. *Bull. Mater. Sci.*, 2019, vol. 42, no. 150, pp. 1–6. doi: 10.1007/s12034-019-1832-2
  24. Cotton G.C., Lagesse N.R., Parke L., Meledandri C.J. Antibacterial nanoparticles. In: *Comprehensive Nanoscience and Nanotechnology*; 2<sup>nd</sup> ed. 2019, vol. 3, pp. 65–82. doi: 10.1016/B978-0-12-803581-8.10409-6

25. Dhiman N.K., Agnihotri S., Shukla R. Silver-based polymeric nanocomposites as antimicrobial coatings for biomedical applications. In: *Nanotechnology In Modern Animal Biotechnology*. Eds.: Singh S., Maurya P. Singapore: Springer, 2019, pp. 115–171. doi: 10.1007/978-981-13-6004-6\_4
26. Dutta R. K., Sharma P.K., Bhargava R., Kumar N., Pandey A.C. Differential susceptibility of Escherichia coli cells toward transition metal-doped and matrix-embedded ZnO nanoparticles. *J. Phys. Chem. B*, 2010, vol. 114, pp. 5594–5599. doi: 10.1021/jp1004488
27. Ferdous Z., Nemmar A. Health impact of silver nanoparticles: a review of the biodistribution and toxicity following various routes of exposure. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, vol. 21, no. 7: 2375. doi: 10.3390/ijms21072375
28. Gabrielyan L., Trchounian A. Antibacterial activities of transient metals nanoparticles and membranous mechanisms of action. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2019, vol. 35, no. 162, pp. 1–10. doi: 10.1007/s11274-019-2742-6
29. Gao N., Chen Y., Jiang J. Ag@Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-GO nanocomposites prepared by a phase transfer method with long-term antibacterial property. *Appl. Mater. Interfaces*, 2013, vol. 5, pp. 11307–11314. doi: 10.1021/am403538j
30. Gupta R., Krishna N., Eswar R., Modak J.M., Madras G. Ag and CuO impregnated on Fe doped ZnO for bacterial inactivation under visible light. *Catal. Today*, 2018, vol. 300, pp. 71–80. doi: 10.1016/j.cattod.2017.05.032
31. Gupta R., Rao Eswar N.K., Modak J.M., Madras G. Visible light driven efficient N and Cu co-doped ZnO for photoinactivation of Escherichia coli. *RSC Adv.*, 2016, vol. 89, no. 6, pp. 85675–85687. doi: 10.1039/C6RA16739J
32. Haja Hameed A.S., Karthikeyan C., Ahamed A.P., Thajuddin N., Alharbi N.S., Alharbi S.A., Ravi G. In vitro antibacterial activity of ZnO and Nd doped ZnO nanoparticles against ESBL producing Escherichia coli and Klebsiella pneumonia. *Sci. Rep.*, 2016, vol. 6, pp. 24312–24323. doi: 10.1038/srep24312
33. He W., Huang X., Zheng Y., Sun Y., Xie Y., Wang Y., Yue L. In situ synthesis of bacterial cellulose/copper nanoparticles composite membranes with longterm antibacterial property. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2018, vol. 29, no. 17, pp. 2137–2153. doi: 10.1080/09205063.2018.1528518
34. Helmlinger J., Sengstock C., Groß-Heitfeld C., Mayer C., Schildhauer T.A., Köller M., Epple M. Silver nanoparticles with different size and shape: equal cytotoxicity, but different antibacterial effects. *RSC Adv.*, 2016, vol. 6, pp. 18490–18501. doi: 10.1039/c5ra27836h
35. Hoseinpour V., Ghaemi N. Novel ZnO-MnO<sub>2</sub>-Cu<sub>2</sub>O triple nanocomposite: Facile synthesis, characterization, antibacterial activity and visible light photocatalytic performance for dyes degradation — a comparative study. *Mater. Res. Express.*, 2018, vol. 5: 085012. doi: 10.1088/2053-1591/aad2c6
36. Hu C., Wang L.-L., Lin Y.-Q., Liang H.-M., Zhou S.-Y., Zheng F., Feng X.-L., Rui Y.-Y., Shao L.-Q. Nanoparticles for the treatment of oral biofilms: current state, mechanisms, influencing factors, and prospects. *Adv. Healthcare Mater.*, 2019, vol. 8, no. 24: 1901301. doi: 10.1002/adhm.201901301
37. Jan T., Azmat S., Mansoor Q., Waqas H.M., Adil M., Ilyas S.Z., Ahmad I., Ismail M. Superior antibacterial activity of ZnO-CuO nanocomposite synthesized by a chemical Co-precipitation approach. *Microb. Pathog.*, 2019, vol. 134: 103579. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103579
38. Jan T., Iqbal J., Ismail M., Zakaullah M., Naqvi S.H., Badshah N. Sn doping induced enhancement in the activity of ZnO nanostructures against antibiotic resistant S. aureus bacteria. *Int. J. Nanomedicine*, 2013, vol. 8, pp. 3679–3687. doi: 10.2147/IJN.S45439
39. Jebel F.S., Almasi H. Morphological, physical, antimicrobial and release properties of ZnO nanoparticles-loaded bacterial cellulose films. *Carbohydr. Polym.*, 2016, vol. 149, pp. 8–19. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.04.089
40. Jones N., Ray B., Ranjit K.T., Manna A.C. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2008, vol. 279, pp. 71–77. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.01012.x
41. Kramer A. Octenidine, Chlorhexidine, Iodine and Iodophores. *Preprint: Georg Thieme Verlag KG*, 2008. 85 p.
42. Li J., Kang L., Wang B., Chen K., Tian X., Ge Z., Zeng J., Xu J., Gao W. Controlled release and long-term antibacterial activity of dialdehyde nanofibrillated cellulose/silver nanoparticle composites. *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 2019, vol. 7, no. 1, pp. 1146–1158. doi: 10.1021/acssuschemeng.8b04799
43. Li J., Zheng J., Yu Y., Su Z., Zhang L., Chen X. Facile synthesis of rGO-MoS<sub>2</sub>-Ag nanocomposites with long-term antimicrobial activities. *Nanotechnology*, 2019, vol. 31, no. 12, pp. 1–27. doi: 10.1088/1361-6528/ab5ba7
44. Liao C., Li Y., Tjong S.C. Bactericidal and cytotoxic properties of silver nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, vol. 20, no. 2: 449. doi: 10.3390/ijms20020449
45. Liu J., Wang Y., Ma J., Peng Y., Wang A. A review on bidirectional analogies between the photocatalysis and antibacterial properties of ZnO. *J. Alloys Compd.*, 2019, vol. 783, pp. 898–918. doi: 10.1016/j.jallcom.2018.12.330
46. Lv Y., Li L., Yin P., Lei T. Synthesis and evaluation of the structural and antibacterial properties of doped copper oxide. *Dalton Trans.*, 2020, vol. 15, no. 49, pp. 4699–4709. doi: 10.1039/D0DT00201A
47. Ma C., Yang Z., Wang W., Hao X., Zhang M., Zhu S., Chen S. Fabrication of Ag-Cu<sub>2</sub>O/PANI nanocomposites for visible-light photocatalysis triggering super antibacterial activity. *J. Mater. Chem. C Mater.*, 2020, vol. 8, pp. 2888–2898. doi: 10.1039/C9TC05891E
48. Ma J., Hui A., Liu J., Bao Y. Controllable synthesis of highly efficient antimicrobial agent-Fe doped sea urchin-like ZnO nanoparticles. *Mater. Lett.*, 2015, vol. 158, no. 1, pp. 420–423. doi: 10.1016/j.matlet.2015.06.037
49. Mahamuni-Badiger P.P., Patil P.M., Badiger M. V., Patel P. R., Thorat Gadgil B.S., Pandit A., Bohara R. A. Biofilm formation to inhibition: Role of zinc oxide-based nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C*, 2020, vol. 108: 110319. doi: 10.1016/j.msec.2019.110319
50. Malka E., Perelshtein I., Lipovsky A., Shalom Y., Naparstek L., Perkash N., Patick T., Lubart R., Nitzan Y., Banin E., Gedanken A. Eradication of multi-drug resistant bacteria by a novel Zn-doped CuO nanocomposite. *Small*, 2013, vol. 9, no. 23, pp. 1–8. doi: 10.1002/sml.201301081
51. Manikandan A.S., Renukadevi K.B., Ravichandran K., Rajkumar P.V., Boubaker K. Enhanced photocatalytic, antibacterial and magnetic properties of ZnO nanopowders through lattice compatible cobalt doping. *J. Mater. Sci. Mater. in Elect.*, 2016, vol. 27, no. 11, pp. 11890–11901. doi: 10.1007/s10854-016-5334-3

52. Matai I., Sachdev A., Dubey P., Kumar S.U., Bhushan B., Gopinath P. Antibacterial activity and mechanism of Ag–ZnO nanocomposite on *S. aureus* and GFP-expressing antibiotic resistant *E. coli*. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 2014, vol. 115, no. 1, pp. 359–367. doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.12.005.
53. Matsuda Y., Okuyama K., Yamamoto H., Fujita M., Abe S., Sato T., Yamada N., Koka M., Sano H., Hayashi M., Sidhu S.K., Saito T. Antibacterial effect of a fluoride-containing ZnO/CuO nanocomposite. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 2019, vol. 458, no. 1, pp. 184–188. doi: 10.1016/j.nimb.2019.06.039
54. Mirjalili A., Zamanian A., Hadavi M.M. TiO<sub>2</sub> Nanotubes-polydopamine-silver composites for long-term antibacterial properties: preparation and characterization. *Biomed. Eng. Appl. Basis Commun.*, 2019, vol. 31, no. 3, pp. 1950023-1–1950023-9. doi: 10.4015/S1016237219500236
55. Mizwari Z.M., Oladipo A.A., Yilmaz E. Chitosan/metal oxide nanocomposites: synthesis, characterization, and antibacterial activity. *Int. J. Polym. Mater.*, 2020, pp. 1–9. doi: 10.1080/00914037.2020.1725753
56. Nagendra G.K., Shivaraj B.W., Manjunatha C., Ayeesha Siddiqua S.A., Suchithra V. Study of structural features and antibacterial property of ZnO/CuO nanocomposites derived from solution combustion synthesis. *IOP Conf. Series: Mater. Sci. Eng.*, 2019, vol. 577: 012111. doi: 10.1088/1757-899X/577/1/012111
57. Nahum Y., Israeli R., Mircus G., Perelshtein I., Ehrenberg M., Gutfreund S., Gedanken A., Bahar I. Antibacterial and physical properties of a novel sonochemical-assisted Zn-CuO contact lens nanocoating. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 2019, vol. 257, pp. 95–100. doi: 10.1007/s00417-018-4172-9
58. Nair M.G., Nirmala M., Rekha K., Anukaliani A. Structural, optical, photo catalytic and antibacterial activity of ZnO and Co doped ZnO nanoparticles. *Mater. Lett.*, 2011, vol. 65, no. 12, pp. 1797–1800. doi: 10.1016/j.matlet.2011.03.079
59. Nastyshyn S., Raczowska J., Stetsyshyn Y., Orzechowska B., Bernasik A., Shymborska Y., Brzywczy-Włoch M., Gosiewski T., Lishchynskiy O., Ohar H., Ochońska D., Awsiuka K., Budkowski A. Non-cytotoxic, temperature-responsive and antibacterial PEOGMA based nanocomposite coatings with silver nanoparticles. *RSC Adv.*, 2020, vol. 10, pp. 10155–10166. doi: 10.1039/c9ra10874b
60. Pal S., Kyung Tak Y., Myong Song J. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, vol. 73, no. 6, pp. 1712–1720. doi: 10.1128/AEM.02218-06
61. Podporska-Carroll J., Myles A., Quilty B., McCormack D., Fagan R., Hinder S.J., Dionysiou D.D., Pillai S.C. Antibacterial properties of F-doped ZnO visible light antibacterial properties of F-doped ZnO visible light photocatalyst. *J. Hazard. Mater.*, 2017, vol. 324, pp. 39–47. doi: 10.1016/j.jhazmat.2015.12.038
62. Pourbeyram S., Bayrami R., Dadkhah H. Green synthesis and characterization of ultrafine copper oxide reduced graphene oxide (CuO/rGO) nanocomposite. *Colloids Surf. A.*, 2017, vol. 529, pp. 73–79. doi: 10.1016/j.colsurfa.2017.05.077
63. Raghunath A., Perumal E. Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: a promise for the future. *Raghunath. Int. J. Antimicrob. Agents.*, 2017, vol. 49, no. 2, pp. 137–152. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.11.011
64. Rai M., Kon K., Gade A., Ingle A., Ingle A., Nagaonkar D., Paralikar P., Silva S.S. Antibiotic resistance mechanisms and new antimicrobial approaches. Chapter 6. Antibiotic resistance: can nanoparticles tackle the problem? Eds.: Kon K., Rai M. *Elsevier*, 2016. 414 p. doi: 10.1016/B978-0-12-803642-6.00001-0
65. Rajabi A., Ghazali M.J., Mahmoudi E., Azizkhani S., Sulaiman N.H., Mohammad A.W., Mustafah N.M., Ohnmar H., Naicker A.S. Development and antibacterial application of nanocomposites: Effects of molar ratio on Ag<sub>2</sub>O–CuO nanocomposite synthesised via the microwaveassisted route. *Ceram. Int.*, 2018, vol. 44, no. 17, pp. 21591–21598. doi: 10.1016/j.ceramint.2018.08.239
66. Rajith Kumar C.R., Virupaxappa Betageri S., Nagaraju G., Pujar G.H., Onkarappa H.S., Latha M.S. One-pot green synthesis of ZnO–CuO nanocomposite and their enhanced photocatalytic and antibacterial activity. *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.*, 2020, vol. 11: 015009. doi: 10.1088/2043-6254/ab6c60
67. Ravichandran K., Rathi R., Baneto M., Karthika K., Rajkumar P.V., Sakthivel B., Damodaran R. Effect of Fe+F doping on the antibacterial activity of ZnO powder. *Ceram. Int.*, 2015, vol. 4, no. 3, pp. 3390–3395. doi: 10.1016/j.ceramint.2014.10.121
68. Rekha K., Nirmala M., Nair M.G., Anukaliani A. Structural, optical, photocatalytic and antibacterial activity of zinc oxide and manganese doped zinc oxide nanoparticles. *Physica B Condens. Matter.*, 2010, vol. 405, no. 15, pp. 3180–3185. doi: 10.1016/j.physb.2010.04.042
69. Sánchez-López E., Gomes D., Esteruelas G., Bonilla L., Lopez-Machado A. L., Galindo R., Cano A., Espina M., Ettcheto M., Camins A., Silva A.M., Durazzo A., Santini A., Garcia M. L., Souto E.B. Metal-based nanoparticles as antimicrobial agents: an overview. *Nanomaterials*, 2020, vol. 10, no. 2, pp. 292–331. doi: 10.3390/nano10020292
70. Saravanan R., Khan M.M., Gupta V.K., Mosquera E., Gracia F., Narayanan V., Stephen A. ZnO/Ag/Mn<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanocomposite for visible light-induced industrial textile effluent degradation, uric acid and ascorbic acid sensing and antimicrobial activities. *RSC Adv.*, 2015, vol. 5, pp. 34645–34651. doi: 10.1039/C5RA02557E
71. Saravanakkumar D., Sivaranjani S., Kaviyarasu K., Ayeshamariam A., Ravikumar B., Pandiarajan S., Veeralakshmi C., Jayachandran M., Maaza M. Synthesis and characterization of ZnO–CuO nanocomposites powder by modified perfume spray pyrolysis method and its antimicrobial investigation. *J. Semicond.*, 2018, vol. 39, no. 3, pp. 033001-1-7. doi: 10.1088/1674-4926/39/3/03300
72. Sirelkhatim A., Mahmud S., Seeni A., Mohamad Kaus N.H., Chuo Ann L., Mohd Bakhori S.K., Hasan H., Mohamad D. Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism. *Nano-Micro Lett.*, 2015, vol. 7, no. 3, pp. 219–242. doi: 10.1007/s40820-015-0040-x
73. Shalom Y., Perelshtein I., Perkas N., Gedanken A., Banin E. Catheters coated with Zn-doped CuO nanoparticles delay the onset of catheter-associated urinary tract infections. *Nano Res.*, 2016, vol. 10, pp. 520–533. doi: 10.1007/s12274-016-1310-8
74. Vallet-Regí M., González B., Izquierdo-Barba I. Nanomaterials as promising alternative in the infection treatment. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, vol. 20, no. 15: 3806. doi: 10.3390/ijms20153806
75. Wei L., Wang H., Wang Z., Yu M., Chen S. Preparation and long-term antibacterial activity of TiO<sub>2</sub> nanotubes loaded with Ag nanoparticles and Ag ions. *RSC Adv.*, 2015, vol. 5, pp. 74347–74351. doi: 10.1039/c5ra12404b.

76. Wiesenmueller S., Cierniak P., Juebner M., Koerner E., Hegemann D., Bender K.M.-C. Tailored antimicrobial activity and long-term cytocompatibility of plasma polymer silver nanocomposites. *J. Biomater. Appl.*, 2018, vol. 33, no. 3, pp. 327–339. doi: 10.1177/0885328218793488
77. Xie K., Zhou K., Guo Y., Wang L., Li G., Zhao S., Liu X., Li J., Jiang W., Wu S., Hao Y. Long-term prevention of bacterial infection and enhanced osteoinductivity of a hybrid coating with selective silver toxicity. *Adv. Healthc. Mater.*, 2019, vol. 8, no. 5, pp. e1801465. doi: 10.1002/adhm.201801465.
78. Yang Z., Hao X., Chen S., Ma Z., Wang W., Wang C., Yue L., Sun H., Shao Q., Murugadoss V., Guo Z. Long-term antibacterial stable reduced graphene oxide nanocomposites loaded with cuprous oxide nanoparticles. *J. Colloid. Interface Sci.*, 2018, vol. 533, pp. 13–23. doi: 10.1016/j.jcis.2018.08.053
79. Yang Z., Ma C., Wang W., Zhang M., Hao X., Chen S. Fabrication of Cu<sub>2</sub>O-Ag nanocomposites with enhanced durability and bactericidal activity. *J. Colloid. Interface Sci.*, 2019, vol. 557, pp. 156–167. doi: 10.1016/j.jcis.2019.09.015
80. Yao S., Feng X., Lu J., Zheng Y., Wang X., Volinsky A.A., Wang L.N. Antibacterial activity and inflammation inhibition of ZnO nanoparticles embedded TiO<sub>2</sub> nanotubes. *Nanotechnology*, 2018, vol. 29, no. 24, pp. 1–29. doi: 10.1088/1361-6528/aabac1
81. Zhong Q., Long H., Hu W., Shi L., Zan F., Xiao M., Tan S., Ke Y., Wu G., Chen H. Dual-function antibacterial micelle via self-assembling block copolymers with various antibacterial nanoparticles. *ACS Omega*, 2020, vol. 5, no. 15, pp. 8523–8533. doi: 10.1021/acsomega.9b04086
82. Zhao R., Lv M., Li Y., Sun M., Kong W., Wang L., Song S., Fan C., Jia L., Qiu S., Sun Y., Song H., Hao R. Stable nanocomposite based on pegylated and silver nanoparticles loaded graphene oxide for long-term antibacterial activity. *ACS Appl. Mater. Interfaces.*, 2017, vol. 9, pp. 15328–1534. doi: 10.1021/acsomega.7b03987
83. Zoha S., Ahmad M., Abbas Zaidi S.J., Naeem Ashiq M., Ahmad W., Park T.J., Basit M.A. ZnO-based mutable Ag<sub>2</sub>S/Ag<sub>2</sub>O multilayered architectures for organic dye degradation and inhibition of *E. coli* and *B. subtilis*. *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, 2020, vol. 394, pp. 112472–112482. doi: 10.1016/j.jphotochem.2020.112472

**Авторы:**

**Мелешко А.А.**, к.т.н., научный сотрудник Института химии Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия;  
**Афиногорова А.Г.**, д.б.н., ведущий научный сотрудник, руководитель испытательного лабораторного центра ФБУН НИИЭМ имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;  
**Афиногенов Г.Е.**, д.м.н., профессор кафедры челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия;  
**Спиридонова А.А.**, аспирант ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;  
**Толстой В.П.**, д.х.н., старший научный сотрудник, профессор Института химии Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия.

**Authors:**

**Meleshko A.A.**, PhD (Technical Sciences), Researcher, Institute of Chemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Afinogenova A.G.**, PhD, MD (Biology), Leading Researcher, Head of Laboratory Testing Centre, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Professor of Surgical Dentistry Department, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Afinogenov G.E.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Professor of Surgical Dentistry Department, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Spiridonova A.A.**, PhD Student, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Tolstoy V.P.**, PhD, MD (Chemistry), Senior Researcher, Professor of the Institute of Chemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation.

# THE COVID-19 PANDEMIC: A SYSTEMATIC REVIEW OF THE CURRENT EVIDENCE

R. Ghomi, N. Asgari, A. Hajiheydari, R. Esteki, F. Biyabanaki, F. Nasirinasab

*Isfahan University of medical science, Isfahan, Iran*

**Abstract.** *Introduction.* An epidemic of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) begun in December 2019 in China, causing primary concern. One of the important issues is its rapid spread around the world. Among the questions raised, disease epidemiology, clinical, laboratory symptoms and radiological findings and treatment of COVID-19 disease have been identified in some studies. But no systematic review on current evidences about COVID-19 has been published. *Objective.* The aim of this study was to determine the COVID-19 epidemiology, clinical features, diagnosis and treatment. *Data sources.* We performed a systematic review of the literature, using the keywords: “coronavirus” and “2020”, “COVID-19” in databases: Science Direct, PubMed, Springer and Scopus during January 1, 2020 to February 23, 2020. *Study Selection.* All observational studies, as well as case reports and editorial that published in English were include. *Data Extraction.* Data on the disease control methods of COVID-19 were extracted by multiple observers. *Results.* 131 articles were retrieved. After screening by abstract and title, 58 articles were selected for full-text assessment. Of them, 43 were finally included for review. The COVID-19 has spread rapidly and can be transmitted via close human-to-human contact via nasopharyngeal or oropharyngeal droplets. The COVID-19, causing considerable problems, especially in patients with comorbidities and old patients. Fever, cough, sore throat and diarrhea are the main clinical features of this emerging disease. The most common radiological finding is bilateral ground-glass view and Lopinavir and Ritonavir are among the antiviral drugs used. *Conclusion.* COVID-19 is a new clinical infectious disease and can be a serious problem for health systems. Additional research is needed to elucidate factors that may mediate the pathogenesis of the severe and fatal associated disease.

**Key words:** *Coronavirus, SARS-CoV-2, COVID-19.*

## ПАНДЕМИЯ COVID-19: СИСТЕМАТИЧЕСКИЙ ОБЗОР СОВРЕМЕННЫХ ДАННЫХ

Гоми Р., Асгари Н., Хаджихейдари А., Эстеки Р., Бийабанаки Ф., Насиринасаб Ф.

*Исфаханский университет медицинских наук, Исфахан, Иран*

**Резюме.** *Введение.* Эпидемия коронавирусного заболевания 2019 г. (COVID-19) началась в декабре 2019 г. в Китае и представляет серьезную проблему. Одним из важных вопросов является ее быстрое распространение во всем мире. В ряде работ были описаны эпидемиология, клинико-лабораторные признаки, рентгенологические характеристики и лечение COVID-19. Однако в настоящее время в доступной литературе отсутствуют систематические обзоры, описывающие накопленные данные по COVID-19. Цель: описание эпидемиологии COVID-19, а также клинических особенностей, диагностики и лечения. *Материалы и методы.* Проведен систематический обзор литературы по ключевым словам «коронавирус» и «2020», «COVID-19» в базах данных: Science Direct, PubMed, Springer и Scopus за период с 1 января 2020 г. по 23 февраля 2020 г. Отбор типа исследований: все обзорные исследования, а также описание клинических случаев и редакционных комментариев на английском языке. Извлечение данных: различными наблюдателями

---

**Адрес для переписки:**

Нагрес Асгари  
Исфаханский Университет медицинских наук, Исфахан, Иран.  
E-mail: krezak1990@gmail.com

**Contacts:**

Narges Asgari  
Shivaye Sharghi st., Khomini shahr, Isfahan, Iran, 9 Dey Hospital,  
Isfahan University of Medical Sciences.  
E-mail: krezak1990@gmail.com

---

**Библиографическое описание:**

Гоми Р., Асгари Н., Хаджихейдари А., Эстеки Р., Бийабанаки Ф., Насиринасаб Ф. Пандемия COVID-19: систематический обзор современных данных // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 4. С. 655–663. doi: 10.15789/2220-7619-TCP-1508

**Citation:**

Ghomi R., Asgari N., Hajiheydari A., Esteki R., Biyabanaki F., Nasirinasab F. The COVID-19 pandemic: a systematic review of the current evidence // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 4, pp. 655–663. doi: 10.15789/2220-7619-TCP-1508

производилось извлечение данных по методам контроля COVID-19. *Результаты.* В результате поиска удалось обнаружить 131 статью. После оценки содержания тезисов и названия статей были отобраны 58 работ для анализа полного текста статей, из которых в обзор включены 43 статьи. COVID-19 быстро распространяется и передается при тесном контакте между людьми через назо- и орофарингеальные аэрозоли. COVID-19 вызывал существенные проблемы, особенно у пациентов с сопутствующими заболеваниями и у лиц пожилого возраста. Основными клиническими чертами COVID-19 были лихорадка, кашель, боли в горле и диарея. Наиболее распространенным рентгенологическим признаком заболевания был картина двустороннего матового стекла. Для этиотропной терапии применялись Лопинавир и Ритонавир. *Выводы.* COVID-19 является новым инфекционным заболеванием и представляет серьезную проблему для здравоохранения. Требуется проведение дополнительных исследований для определения факторов, которые могут опосредовать развитие патогенеза тяжелой и фатальной формы заболевания.

**Ключевые слова:** коронавирус, SARS-CoV-2, COVID-19.

## Introduction

The illness was first announced on 31 December 2019 that caused by coronavirus [23, 61], was introduced on January 12 by the World Health Organization (WHO) as the novel coronavirus 2019 or 2019 nCoV [14, 74] because Wuhan Viral Pneumonia cases were discovered at the end of 2019. COVID-19 was first identified in Wuhan, China, among a cluster of patients that presented with an unidentified form of viral pneumonia with shared history of visiting the Huanan seafood Market [45].

COVID-19 is a new type of virus that has not been identified before in humans [28]. Coronaviruses are zoonotic and are a large family of viruses that cause illness ranging from the common cold to more severe diseases, such as MERS and SARS [21].

2019-nCoV is considered to be one of the close relatives of SARS-COV, because it is very homologous to SARS-COV. 2019-nCoV was classified by the International Commission on Virus Classification (ICTV) on February 11, 2020 as the severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) [29].

The rapid spread of the virus is fueling fears of a global pandemic [17], and over 150 countries have confirmed cases to date, all continents reported confirmed cases of COVID-19. As of March 15, 2020, more than 167,000 confirmed cases have been re-

ported worldwide, with a rapid rise in the number of deaths (6500 deaths and 76,453 recovered) [61]

As expected, several similarities and differences in the epidemiology, clinical features, and management of SARS, MERS, and COVID have been identified [1, 6, 8, 11, 29]. Although the clinical picture of SARS, MERS, and COVID seems to be similar, since early reports, differences were noted [1, 8, 11]. Then, full clinical and epidemiological characterization of disease, as well as their laboratory and image findings and is required.

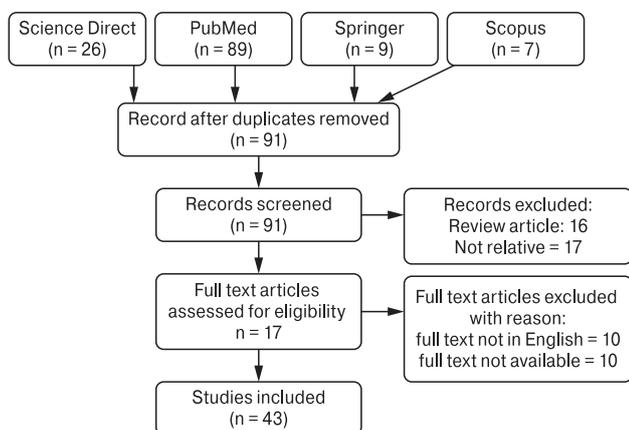
Therefore, this study was conducted to systematically investigate the published studies on disease epidemiology, clinical, laboratory symptoms and radiological findings and treatment of COVID-19 disease.

**Objective.** The aim of this study was to determine the COVID-19 epidemiology, clinical features, diagnosis and treatment.

**Data sources.** This protocol follows the recommendations established by the PRISMA statement [42]. Search was done in order to obtain data using the keywords: “coronavirus” and “2020”, “COVID-19” in databases: Science Direct, PubMed, Springer and Scopus during January 1, 2020 to February 23, 2020. Five different researchers independently evaluated search results.

**Study selection.** All the observational studies, and also case reports, editorial that published in English were included. The preliminary search result was about 131 articles with the term COVID-19 or coronavirus in the title, abstract or text published in English. After reviewing the articles and deleting repetitive articles, to determine whether the article was relevant to the main purpose of the review or not, two authors were reviewed separately titles and abstracts. In the case of ambiguity, the authors referred to the full text for the final decision. Figure displays the process of selecting articles.

**Data Extraction:** information on the type of publication, the publishing institution, country, year and date of publication and strategies for infection control were extracted independently by five investigators (table 1 displays the Characteristics of the included studies). A sixth researcher checked the article list and data extractions to ensure there were no duplicate articles.



**Figure. Study selection and characteristics**

**Table. Characteristics of the included studies on COVID-19, 2020**

Author	Date	Study type	N	Mean age	Sex	Comorbidities	Mortality
Kim	02/24	case report	2	35–55	female		
H. Chen	02/12	case report	9	26–40	female	pregnanacy	
Bai	02/21	case report	6	42–57	66.6% female 33.4% male		
Gostic	02/19	modeling strategy					
Y. Zhang	02/19	editorial					8% (male age > 60)
Tong	02/29	case report	7	31	4 male 3 female		
Lim	02/17	case report	1	54	male		
Sabino-Silva	02/17	editorial					
Van Cuong	02/18	case report	1	25	female		
Guarner	02/20	editorial		55			2–3%
Velavan	02/20	editorial					2.2%
Lin	02/04	case report	2	37 (35, 39)	male	comorbidity	
Wong	02/20	editorial					
Liem	02/18	editorial					
Guan	02/23	cohort retrospective		47 (35–58)	58% male	hypertension	1.4%
Y. Yang	02/23	cohort retrospective				HTN COPD	
Jalavaa	02/25	case report				smoker	2%
Zh. Xu	02/26	case report					
J. Zhang	02/29	cohort retrospective	140	57 (25–87)	50.7% male	(64.3%) comorbidity HTN (30.0%); D.M (12.1%); drug hypersensitivity (11.4%); urticaria (1.4%); COPD (1.4%); smokers (1.4%)	
Team	02/20	case report	15	43 (8–66)	60% male	HTN/D.M/comorbidity	2.8%
MacLaren	02/19	editorial					
Gao		editorial	100				
Xu	02/21	cohort retrospective	55	44 (3–85)			
X. Chen	02/24	editorial					
Y. Zhu	02/26	observational	80				2.5%
Ch. Lin	02/26	case report	1	61			
Cheng	02/20	editorial		Mean > 40			
Wu, Jiong	02/20	case report	1	80			
Lancet	02/20	editorial					
Song	02/20	editorial					
Lum	02/20	editorial				comorbidity	
Kim	02/20	observational					
Lai	02/20	retrospective review		< 18		HTN/Cardiac disease/D.M	Male Old age
Habibzadeh	02/20	retrospective review		49–61			
Qiao	02/20	case report	1				
Albarelo	02/20	case report	2	66–67			
Yang	02/03	retrospective review	52	Mean: 60			5.6% (old age comorbidity)
Pan	02/03	observational	41				
Q. Chen	02/03	observational	13				
Yang	02/04	editorial		Mean > 60			
Liu	02/18	observational					
C. Wu	02/18	editorial					
Tian	02/19	retrospective review	262	47.5			0.9%
Qin	02/21	retrospective review	4	59.2%			

## Results

*Mode of transmission.* Person-to-person transmission in travelers who are sick or carriers [36, 73], close contact [15, 25, 33, 37, 52, 55, 69], use of shared food container [55], nasopharyngeal or oropharyngeal drops [30, 38, 49, 69] through contact with infectious surfaces or contact with a person [24], isolation of negative pressure and high pollution of personnel [13], also in people who have visited the Hanan animal market [30, 33, 69], contact with wild animals (seafood, wholesale market of chicken and bats, etc.) in the city of Wuhan [15, 40, 67], animal-to-human transmission [15, 33], and then person-to-person transmission [15] were among the factors influencing the spread of the virus. Studies have shown that the virus is not transmitted through breast milk only when breastfeeding by close contact with the mother [46].

Travel from Wuhan to other countries [2], relocation of residents between Hubby and other states [25, 40], and the departure of millions of Chinese from Wuhan for the Chinese New Year Festival [25] led to the release of the new Coronavirus. Some articles have referred to the greater sensitivity of Asian races to viral infections [15], while identifying and treating patients as early as possible can prevent the spread of the disease [41].

*Risk factors.* In the review, some risk factors affecting the prevalence of COVID-19 disease were identified, including age, underlying diseases, health status, contact history, travel to infected areas and work and living environment. In most studies, the age of people with the disease is 60 years and older [30, 33, 38, 58, 69, 74]. The disease is very rare in children and even if children have it, it occurs with very mild symptoms [60]. The underlying diseases in the elderly are considered as a risk factor, so that 25% of the elderly with the disease have had underlying disease [40]. The underlying disease in all other age groups is also considered as a risk factor [38], history of hypertension [25, 33, 69, 71], which in some articles includes 15% of cases [25] and in some cases up to 30% of cases [71], history of chronic lung disease (COPD) [69, 71], history of diabetes mellitus [33, 71, 74], history of cardiovascular diseases [33] and other chronic diseases [38, 67, 74] as mentioned in some articles, 40% of cases are related to people with a history of chronic disease [67], severe drug sensitivity and urticaria are less commonly identified as risk factors [71]. Although pregnancy is not a disease, pregnant women are more exposed to the disease due to physiological changes during pregnancy [10].

COVID-19 is highly contagious and spreads rapidly, so that in some studies, close contact with infected individuals are reported in 60.4% of cases [54]. In another study, 19% of new cases of direct contact with approved patients were confirmed [67]. Contact with Wuhan residents caused a high percentage of patients (72.3%). It was specified that some people

are infected without any previous contact with infectious people or environment [25]. In the Australia 10% of people were infected without direct contact history [54].

Living in infected places and cities has also been identified as a major risk factor. Living in Wuhan [25, 36, 54], visiting Wuhan market [57], visiting seafood market of Wuhan [67] can also be seen in the history of infected people.

Provincial travels to China and travels from China to other countries led to the spread of COVID-19 [18], so that in the 2<sup>nd</sup> Epidemiology Report of Australia, 80% of patients mentioned the history of recent travel to China [18]. The first cases of coronavirus infection in Italy were related to travelers traveling from China to this country [2].

*Clinical manifestations.* Clinical manifestations in COVID-19 include a wide range of symptoms, some respiratory and some non-specific symptoms. Fever [2, 10, 18, 25, 26, 27, 36, 38, 40, 47, 49, 54, 55, 57, 58, 63, 65, 66, 67, 71] has been identified as the most common symptom. In some sources, intermittent fever of [36] or fever over degrees has been reported [63, 66]. In some studies, the identified patients have not reported a history of fever [10, 37]. Chill alone [18, 36] or chills with fever [47] are other symptoms. Respiratory symptoms include cough [10, 18, 19, 25, 26, 33, 38, 40, 49, 54, 57, 58, 63, 66, 71], chest pain [57], dizziness [47], dry cough [18, 27, 47, 65, 73] productive cough [66], nasal congestion [58], restlessness [27, 33], headache [27, 33, 66], weakness [10], muscle cramps [66], sore throat [10, 38, 47, 66], mild shortness of breath [36]. Gastrointestinal symptoms are rare but most important are diarrhea [10, 25, 27, 30, 40, 66, 71].

In case of exacerbation of the disease, exacerbation of cough and shortness of breath [32], fever and dry cough and six days after hospitalization, pneumonia symptoms were observed in CT [36]. Symptoms of pneumonia and kidney failure [49], lung involvement 4 days after hospitalization [57], pneumonia [26], 95% pneumonia and decreasing blood oxygen level [58], respiratory failure (ARDS) [38], shortness of breath [65], pneumonia [18], arrhythmia and shock [52], and finally, the need for mechanical ventilation in the ICU and the progressive symptoms of respiratory failure [2] are among the symptoms of exacerbation of the disease. The average time of intubation of the patient is 6–7 days and the average time of onset of the disease and doctor's visit is 4–5 days [54].

*Incubation period.* The incubation period of COVID-19 is at least 2 to 7 days [18, 25, 38, 65, 74] and maximum 14 [65] to 28 days [67] and in some sources 19 days [36]. The average time interval between the onset of symptoms and the time it needs for a person to be admitted is between 4 and 8 days, and from the onset of symptoms to the onset of ARSD, it is 6 to 12 days [18].

*Diagnosis.* In patients with COVID-19 disease, the results of laboratory tests such as CBC change significantly. The changes of CBC test results include decreasing white blood cells [57], lymphopenia [5, 10, 25, 27, 71, 73] and neutropenia [38], thrombocytopenia [25], leukopenia [25, 33, 66], and eosinopenia [71]. Disorders of liver enzymes include an increase in ALT, AST [10, 27], inflammatory reactions in the body and as a result, increasing CRP [5, 10, 24, 26, 66, 71] and increasing interleukin [27, 73], as well as changes in the rate of arterial blood gases (ABG) [58] and some nonspecific changes, such as increasing serum ferritin level [27], and increasing procalcitonin [71], are evident.

Changes in the CT-SCAN of the lungs include infiltration of the lungs, which is usually observed at the end of the first week of illness [31], where the lesions are seen bilaterally [67]. Patchy [10, 71] lesions, bilaterally [15, 16, 18, 22, 24, 26, 37, 40, 44, 47, 50, 51, 52] ground glass view [10], consolidation [44, 47, 66], bilateral invasive lesions [27, 36, 55], lower lobe involvement [38, 58, 66], and lung alveoli involvement [58] is evident. There are also pulmonary lesions with high absorption characteristics and evidence of lymph node involvement, although there is no diffuse disease. The findings show that COVID-19 disease leads to enlargement of the pulmonary arteries [2].

*Treatments.* Some articles have referred to the use of antiviral drugs [10, 26, 37] and others have referred to the treatment of antibiotics [10, 25] according to the infectious and viral nature of COVID-19 disease. In some articles, the use of antibiotics has been referred for secondary infections. Lopinavir and Ritonavir [32, 33, 36, 40, 58, 60, 73], Remdesivir [58, 60], Oseltamivir [32, 73], Baricitinib [58], Ganciclovir [32, 62], Ribavirin [62] are among the antiviral drugs used. In some cases, immunoglobulin use has been proposed [58], some sources have proposed the use of glucocorticoids [25] and methylprednisolone [58], some pharmacological agents used in the treatment of malaria such as hydroxychloroquine [58], chloroquine sulfate [22] have been used. According to the symptoms and respiratory complications of COVID-19 disease, some patients need respiratory support, including oxygen therapy [10, 15, 25, 27], the need for mechanical ventilation [15, 25] and in some cases even the need for extracorporeal oxygen (ECMO) [25, 41]. Liquid therapy is also used in supportive therapies [15, 27].

*Complications of disease.* According to the widespread prevalence and nature of the rapid spread of COVID-19 disease, as well as complications and mortality due to this disease, some psychological and social complications such as anxiety [39, 52, 74] and depression [39, 74], psychological distress [12, 39], PTSD [74], distrust and panic [52], social panic [30] have been reported.

It has been reported that pregnant mothers with COVID-19 have premature birth (36 weeks), baby

birth with low weight (less than 2,500 grams), and changes in the baby's myocardial enzymes [10].

The respiratory nature of the disease caused some respiratory complications such as ARDS [2, 33, 67], irritability [12], shock [33], need for hospitalization in the intensive care unit (ICU), pneumothorax [67], and pleural effusion [2]. Following the hospitalization of patients, some complications such as nosocomial infections [67] are proposed. Other non-specific complications of COVID-19 include liver dysfunction [67], renal failure and acute cardiac injury [33, 67].

*Other results.* At the time of the prevalence of COVID-19, some challenges are proposed, including rumors of fear and the need for credible and valid sources of information, and instant and instantaneous training through public media, which is very helpful [19, 52]. Paying attention to the health of some vulnerable groups, such as the elderly, especially the elderly who live alone and do not have access to Internet services and education, and the health problems that proposes during quarantine [68] are another challenge in monitoring the health of staff [35]. One of the problems mentioned by health care workers is the problem of working with wearing personal protective equipment (PPE) [12, 74].

## Discussion

Coronavirus is genetically similar to MERS and SARS, and there are similarities between COVID-19 and SARS viruses in terms of diagnosis and treatment, epidemiology, and clinical symptoms.

Compared to SARS and MERS, COVID-19 spreads very fast [64]. The prevalence of SARS and MERS between people occurs through close contact. In COVID-19, the person to person transfer is through coughing and sneezing. But the speed of release is higher in COVID-19 [9]. The similarity of new coronavirus to in person-to-person transfer to the SARS virus is more similar to MERS virus [7].

In many sources, the prevalence of fever has been mentioned in patients with COVID-19 as the most common symptom. Fever can be with or without chill and in COVID-19, dry cough is mentioned as the most common respiratory symptoms. The prevalence of fever and cough are similar to MERS and SARS [19, 53]. And MERS is started with fever and cough and lower parts of lung is involved [19, 43, 53, 70].

According to the results of the present study, breathing shortness has been observed in most patients that cough and shortness of breath is intensified with the continuation of the disease and pneumonia symptoms appear, and in most of these patients, lead to ARDS. Most patients also needed hospitalization, which could be related to a patient's previous underlying illness. A number of them were also hospitalized in the ICU. In severe cases, the breathing shortness is worsened, that mechanical ventilation and ICU hospitalization was needed finally. In SARS epide-

mics, bilateral airway involvement was seen in the majority of patients. They also experienced a dry, dyspnea cough [72].

In patients with COVID-19, lung CT changes such as lung infiltration and bilateral lesions and patchy and bilateral ground-glass opacity are present, as well as involvement of the lower lobes of lung is created. At SARS, patients with lung CT had ground-glass opacity [29, 52, 67].

In MERS and SARS, diarrhea was seen in 20 to 25% of patients [59]. In COVID-19, the prevalence of diarrhea is very low.

Lymphopenia was observed in 40% of the patients. Data from studies conducted during 2003–2002 showed that in SARS, lymphopenia, leukopenia, and thrombocytopenia, an increase in LDH, ALT, AST, and creatine kinase were observed [34, 56]. According to the frequency and prevalence of lymphopenia, it can be concluded that COVID-19 acts on lymphocytes (especially T-lymphocytes, similar to SARS-COV performance).

Patients with COVID-19 have changes in CBC results such as lymphopenia, neutropenia, thrombocytopenia, and leukopenia and eosinopenia. Also in COVID-19, liver enzymes such as ALT and AST increase.

The prevalence (RO) of COVID is 2–3 times, while the prevalence of SARS is 2–5 times [9].

COVID are more prevalence than SARS and MERS, which led to the globalization of the epidemic [64]. In MERS, older people and with underlying disease had more severe degree of the disease [48], in COVID, the average age of people with the disease is 60 years and older, and 25% of older people have underlying disease, although there is an underlying disease in other age groups.

In MERS, the average age of the deceased people was 50 years, and 50% of the patients had underlying disease [48], and in COVID-19, people aged 60 and older were exposed at higher risk for death.

In MERS, hospitalized individuals have a history of contact with infected people or have a history of traveling to infected areas [4], and in COVID-19, transfer from suspected individuals to others has been reported.

PCR is the method of diagnosis in COVID such as SARS and MERS [3] and in COVID such as SARS and MERS, due to pneumonia and changes in the lungs, radiological diagnosis is used as the most important diagnostic tool and to determine the severity of the disease [29]. In MERS, SARS, a combination of Lopinavir and Ritonavir [3, 16] has been used and had minimal clinical complications [16]. Broad-spectrum antiviral drugs, commonly called Remdesivir, have been used to treat SARS and MERS [50, 51]. In COVID, Lopinavir and Ritonavir antiviral drugs have been used for treatment.

*Limitations.* This review has several limitations. First, still few studies are available for inclusion. It would be better to include as many studies not only from China, once these have been published, to get a more comprehensive understanding of COVID-19. Second, few studies are not available in English or full text.

## Conclusion

COVID-19 is an emerging viral disease that is highly contagious and has spread rapidly across five continents via person-to-person transmission, close contact via nasopharyngeal or oropharyngeal droplets. The COVID-19, causing considerable problems, especially in patients with comorbidities and old patients. Fever, cough, and dyspnea are the main clinical features of this emerging disease. The most common radiological finding is bilateral ground glass view and Lopinavir and Ritonavir are among the antiviral drugs used. Additional research is needed to elucidate factors that may mediate the pathogenesis of the severe and fatal associated disease.

## References

1. Al-Tawfiq J.A., Zumla A., Memish Z.A. Travel implications of emerging coronaviruses: SARS and MERS-CoV. *Travel Med. Infect. Dis.*, 2014, vol. 12, no. 5, pp. 422–428. doi: 10.1016/j.tmaid.2014.06.007
2. Albarello F., Pianura E., Di Stefano F., Cristofaro M., Petrone A., Marchioni L., Palazzolo C., Schininà V., Nicastrì E., Petrosillo N., Campioni P., Eskild P., Zumla A., Ippolito G.; COVID 19 INMI Study Group. 2019-novel Coronavirus severe adult respiratory distress syndrome in two cases in Italy: an uncommon radiological presentation. *Int. J. Infect. Dis.*, 2020, vol. 93, pp. 192–197. doi: 10.1016/j.ijid.2020.02.043
3. Arabi Y.M., Allothman A., Balkhy H.H., Al-Dawood A., Al-Johani S., Al-Harbi S., Kojan S., Al-Jeraisy M., Deeb A.M., Assiri A.M., Al-Hameed F., Al-Saedi A., Mandourah Y., Almekhlafi G.A., Sherbeeni N.M., Elzein F.E., Memon J., Taha Y., Almotairi A., Maghrabi K.A., Qushmaq I., Al-Bshabshe A., Kharaba A., Shalhoub S., Jose J., Fowler R.A., Hayden F.G., Hussein M.A.; The MIRACLE trial group. Treatment of Middle East Respiratory Syndrome with a combination of lopinavir-ritonavir and interferon-β1b (MIRACLE trial): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*, 2018, vol. 19, no. 1: 81. doi: 10.1186/s13063-017-2427-0
4. Assiri A., Al-Tawfiq J.A., Al-Rabeeh A.A., Al-Rabiah F.A., Al-Hajjar S., Al-Barrak A., Flemban H., Al-Nassir W.N., Balkhy H.H., Al-Hakeem R.F., Makhdoom H.Q., Zumla A.I., Memish Z.A. Epidemiological, demographic, and clinical characteristics of 47 cases of Middle East respiratory syndrome coronavirus disease from Saudi Arabia: a descriptive study. *Lancet Infect. Dis.*, 2013, vol. 13, no. 9, pp. 752–61. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70204-4
5. Bai Y., Yao L., Wei T., Tian F., Jin D.Y., Chen L., Wang M. Presumed asymptomatic carrier transmission of COVID-19. *JAMA*, 2020, vol. 323, no. 14, pp. 1406–1407. doi: 10.1001/jama.2020.2565

6. Bonilla-Aldana D.K., Quintero-Rada K., Montoya-Posada J.P., Ramírez-Ocampo S., Paniz-Mondolfi A., Rabaan A.A., Sah R., Rodríguez-Morales A.J. SARS-CoV, MERS-CoV and now the 2019-novel CoV: have we investigated enough about coronaviruses? A bibliometric analysis. *Travel Med. Infect. Dis.*, 2020, vol. 33: 101566. doi: 10.1016/j.tmaid.2020.101566
7. Centers for Disease Control and Prevention C. 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV). 2020. URL: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/index.html>
8. Chan J.F., Yuan S., Kok K.H., To K.K., Chu H., Yang J., Xing F., Liu J., Yip C.C., Poon R.W., Tsoi H.W., Lo S.K., Chan K.H., Poon V.K., Chan W.M., Ip J.D., Cai J.P., Cheng V.C., Chen H., Hui C.K., Yuen K.Y. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet*, 2020, vol. 395, no. 10223, pp. 514–523. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30154-9
9. Chan-Yeung M., Xu R.H. SARS: epidemiology. *Respirology*, 2003, vol. 8 (suppl. 1), pp. S9–S14. doi: 10.1046/j.1440-1843.2003.00518.x. PMID: 15018127; PMCID: PMC7169193.
10. Chen H., Guo J., Wang C., Luo F., Yu X., Zhang W., Li J., Zhao D., Xu D., Gong Q., Liao J., Yang H., Hou W., Zhang Y. Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women: a retrospective review of medical records. *Lancet*, 2020, vol. 395, pp. 809–815. doi: 10.1016/j.jemermed.2020.04.003
11. Chen N., Zhou M., Dong X., Qu J., Gong F., Han Y., Qiu Y., Wang J., Liu Y., Wei Y., Xia J., Yu T., Zhang X., Zhang L. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*, 2020, vol. 395, no. 10223, pp. 507–513. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7
12. Chen Q., Liang M., Li Y., Guo J., Fei D., Wang L., He L., Sheng C., Cai Y., Li X., Wang J., Zhang Z. Mental health care for medical staff in China during the COVID-19 outbreak. *Lancet Psychiatry*, 2020, vol. 7, no. 4, pp. e15–e16. doi: 10.1016/S2215-0366(20)30078-X
13. Chen X., Tian J., Li G., Li G. Initiation of a new infection control system for the COVID-19 outbreak. *Lancet Infect Dis.*, 2020, vol. 20, no. 4, pp. 397–398. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30110-9
14. Chen Y., Liu Q., Guo D. Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis. *J. Med. Virol.*, 2020, vol. 92, no. 4, pp. 418–423. doi: 10.1002/jmv.25681
15. Cheng Z.J., Shan J. 2019 Novel coronavirus: where we are and what we know. *Infection.*, 2020, vol. 48, no. 2, pp. 155–163. doi: 10.1007/s15010-020-01401-y
16. Chu C.M., Cheng V.C., Hung I.F., Wong M.M., Chan K.H., Chan K.S., Kao R.Y., Poon L.L., Wong C.L., Guan Y., Peiris J.S., Yuen K.Y.; HKU/UCH SARS Study Group. Role of lopinavir/ritonavir in the treatment of SARS: initial virological and clinical findings. *Thorax*, 2004, vol. 59, no. 3, pp. 252–256. doi: 10.1136/thorax.2003.012658
17. Cohen E.C. CDC to screen at three US airports for signs of new virus from China. CNN Health. 2020. January 17. URL: <https://edition.cnn.com/2020/01/17/health/wuhan-virus-us-airport-screenings-china-bn/index.html>
18. COVID-19 National Incident Room Surveillance Team. COVID-19, Australia: Epidemiology Report 2 (Reporting week ending 19:00 AEDT 8 February 2020). *Commun. Dis. Intell.* (2018), 2020: 44. doi: 10.33321/cdi.2020.44.14
19. COVID-19: fighting panic with information. *Lancet*, 2020, vol. 395, no. 10224, p. 537. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30379-2
20. De Groot R.J., Baker S.C., Baric R.S., Brown C.S., Drosten C., Enjuanes L., Fouchier R.A., Galiano M., Gorbalenya A.E., Memish Z.A., Perlman S., Poon L.L., Snijder E.J., Stephens G.M., Woo P.C., Zaki A.M., Zambon M., Ziebuhr J. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. *J. Virol.*, 2013, vol. 87, no. 14, pp. 7790–7792. doi: 10.1128/JVI.01244-13
21. De Wit E., van Doremalen N., Falzarano D., Munster V.J. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2016, vol. 14, no. 8, pp. 523–534. doi: 10.1038/nrmicro.2016.81
22. Gao J., Tian Z., Yang X. Breakthrough: Chloroquine phosphate has shown apparent efficacy in treatment of COVID-19 associated pneumonia in clinical studies. *Biosci. Trends*, 2020, vol. 14, no. 1, pp. 72–73. doi: 10.5582/bst.2020.01047
23. Gardner L. Mapping COVID-19. 2020. URL: <https://systems.jhu.edu/research/public-health/ncov>
24. Gostic K., Gomez A.C., Mummah R.O., Kucharski A.J., Lloyd-Smith J.O. Estimated effectiveness of symptom and risk screening to prevent the spread of COVID-19. *Elife*, 2020, vol. 9: e55570. doi: 10.7554/eLife.55570
25. Guan W., Ni Z., Hu Y., Liang W., Ou C., He J., Liu L., Shan H., Lei C., Hui D.S.C., Du B., Li L., Zeng G., Yuen K.-Y., Chen R., Tang C., Wang T., Chen P., Xiang J., Li S., Wang J., Liang Z., Peng Y., Wei L., Liu Y., Hu Y., Peng P., Wang J., Liu J., Chen Z., Li G., Zheng Z., Qiu S., Luo J., Ye C., Zhu S., Zhong N., for the China Medical Treatment Expert Group for Covid-19. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.*, 2020, vol. 382, pp. 1708–1720. doi: 10.1056/NEJMoa2002032
26. Guarner J. Three emerging coronaviruses in two decades. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2020, vol. 153, no. 4, pp. 420–421. doi: 10.1093/ajcp/aaqa029
27. Habibzadeh P., Stoneman E.K. The Novel Coronavirus: a bird's eye view. *Int. J. Occup. Environ. Med.*, 2020, vol. 11, no. 2, pp. 65–71. doi: 10.15171/ijocem.2020.1921
28. Hernández J.C., Austin Ramzy T. China confirms new coronavirus spreads from humans to humans. *The New York Times*. 2020. 24 January. URL: <https://www.nytimes.com/2020/01/20/world/asia/coronavirus-china-symptoms.html>
29. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., Zhang L., Fan G., Xu J., Gu X., Cheng Z., Yu T., Xia J., Wei Y., Wu W., Xie X., Yin W., Li H., Liu M., Xiao Y., Gao H., Guo L., Xie J., Wang G., Jiang R., Gao Z., Jin Q., Wang J., Cao B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, 2020, vol. 395, no. 10223, pp. 497–506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5
30. Jalava K. First respiratory transmitted food borne outbreak? *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 2020, vol. 226: 113490. doi: 10.1016/j.ijheh.2020.113490
31. Kim H. Outbreak of novel coronavirus (COVID-19): What is the role of radiologists? *Eur. Radiol.*, 2020, vol. 30, pp. 3266–3267. doi: 10.1007/s00330-020-06748-2
32. Kim J.Y., Ko J.H., Kim Y., Kim Y.J., Kim J.M., Chung Y.S., Kim H.M., Han M.G., Kim S.Y., Chin B.S. Viral load kinetics of SARS-CoV-2 infection in first two patients in Korea. *J. Korean Med. Sci.*, 2020, vol. 35, no. 7: e86. doi: 10.3346/jkms.2020.35.e86

33. Lai C.C., Shih T.P., Ko W.C., Tang H.J., Hsueh P.R. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2020, vol. 55, no. 3: 105924. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105924
34. Lee N., Hui D., Wu A., Chan P., Cameron P., Joynt G.M., Ahuja A., Yung M.Y., Leung C.B., To K.F., Lui S.F., Szeto C.C., Chung S., Sung J.J. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N. Engl. J. Med.*, 2003, vol. 348, no. 20, pp. 1986–1994. doi: 10.1056/NEJMoa030685
35. Liem A., Wang C., Wariyanti Y., Latkin C.A., Hall B.J. The neglected health of international migrant workers in the COVID-19 epidemic. *Lancet Psychiatry*, 2020, vol. 7, no. 4: e20. doi: 10.1016/S2215-0366(20)30076-6
36. Lim J., Jeon S., Shin H.Y., Kim M.J., Seong Y.M., Lee W.J., Choe K.W., Kang Y.M., Lee B., Park S.J. Case of the index patient who caused tertiary transmission of COVID-19 infection in Korea: the application of Lopinavir/Ritonavir for the treatment of COVID-19 infected pneumonia monitored by quantitative RT-PCR. *J. Korean. Med. Sci.*, 2020, vol. 35, no. 6: e79. doi: 10.3346/jkms.2020.35.e79
37. Lin C., Ding Y., Xie B., Sun Z., Li X., Chen Z., Niu M. Asymptomatic novel coronavirus pneumonia patient outside Wuhan: the value of CT images in the course of the disease. *Clin. Imaging*, 2020, vol. 63, pp. 7–9. doi: 10.1016/j.clinimag.2020.02.008
38. Lin X., Gong Z., Xiao Z., Xiong J., Fan B., Liu J. Novel coronavirus pneumonia outbreak in 2019: computed tomographic findings in two cases. *Korean J. Radiol.*, 2020, vol. 21, no. 3, pp. 365–368. doi: 10.3348/kjr.2020.0078
39. Liu S., Yang L., Zhang C., Xiang Y.T., Liu Z., Hu S., Zhang B. Online mental health services in China during the COVID-19 outbreak. *Lancet Psychiatry*, 2020, vol. 7, no. 4, pp. e17–e18. doi: 10.1016/S2215-0366(20)30077-8
40. Lum L.H.W., Tambyah P.A. Outbreak of COVID-19 — an urgent need for good science to silence our fears? *Singapore Med. J.*, 2020, vol. 61, no. 2, pp. 55–57. doi: 10.11622/smedj.2020018
41. MacLaren G., Fisher D., Brodie D. Preparing for the most critically ill patients with COVID-19: the potential role of extracorporeal membrane oxygenation. *JAMA*, 2020, vol. 323, no. 13, pp. 1245–1246. doi: 10.1001/jama.2020.2342
42. Moher D., Liberati A., Tetzlaff J., Altman D.G.; PRISMA Group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med.*, 2009, vol. 6, no. 7: e1000097. doi: 10.1371/journal.pmed.1000097
43. Nassar M.S., Bakhrebah M.A., Meo S.A., Alsuaibeyl M.S., Zaher W.A. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) infection: epidemiology, pathogenesis and clinical characteristics. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 2018, vol. 22, no. 15, pp. 4956–4961. doi: 10.26355/eurrev\_201808\_15635
44. Pan Y., Guan H. Imaging changes in patients with 2019-nCov. *Eur. Radiol.*, 2020, vol. 30, no. 7, pp. 3612–3613. doi: 10.1007/s00330-020-06713-z
45. Peeri N.C., Shrestha N., Rahman M.S., Zaki R., Tan Z., Bibi S., Baghbanzadeh M., Aghamohammadi N., Zhang W., Haque U. The SARS, MERS and novel coronavirus (COVID-19) epidemics, the newest and biggest global health threats: what lessons have we learned? *Int. J. Epidemiol.*, 2020, vol. 49, no. 3, pp. 717–726. doi: 10.1093/ije/dyaa033
46. Qiao J. What are the risks of COVID-19 infection in pregnant women? *Lancet*, 2020, vol. 395, no. 10226, pp. 760–762. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30365-2
47. Qin C., Liu F., Yen T.C., Lan X. 18F-FDG PET/CT findings of COVID-19: a series of four highly suspected cases. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2020, vol. 47, no. 5, pp. 1281–1286. doi: 10.1007/s00259-020-04734-w
48. Rivers C.M., Majumder M.S., Lofgren E.T. Risks of death and severe disease in patients with Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus, 2012–2015. *Am. J. Epidemiol.*, 2016, vol. 184, no. 6, pp. 460–464. doi: 10.1093/aje/kww013
49. Sabino-Silva R., Jardim A.C.G., Siqueira W.L. Coronavirus COVID-19 impacts to dentistry and potential salivary diagnosis. *Clin. Oral Investig.*, 2020, vol. 24, no. 4, pp. 1619–1621. doi: 10.1007/s00784-020-03248-x
50. Sheahan T.P., Sims A.C., Graham R.L., Menachery V.D., Gralinski L.E., Case J.B., Leist S.R., Pyrc K., Feng J.Y., Trantcheva I., Bannister R., Park Y., Babusis D., Clarke M.O., Mackman R.L., Spahn J.E., Palmiotti C.A., Siegel D., Ray A.S., Cihlar T., Jordan R., Denison M.R., Baric R.S. Broad-spectrum antiviral GS-5734 inhibits both epidemic and zoonotic coronaviruses. *Sci. Transl. Med.*, 2017, vol. 9, no. 396: eaal3653. doi: 10.1126/scitranslmed.aal3653
51. Sheahan T.P., Sims A.C., Leist S.R., Schäfer A., Won J., Brown A.J., Montgomery S.A., Hogg A., Babusis D., Clarke M.O., Spahn J.E., Bauer L., Sellers S., Porter D., Feng J.Y., Cihlar T., Jordan R., Denison M.R., Baric R.S. Comparative therapeutic efficacy of remdesivir and combination lopinavir, ritonavir, and interferon beta against MERS-CoV. *Nat. Commun.*, 2020, vol. 11, no. 1, p. 222. doi: 10.1038/s41467-019-13940-6
52. Song P., Karako T. COVID-19: Real-time dissemination of scientific information to fight a public health emergency of international concern. *Biosci. Trends*, 2020, vol. 14, no. 1, pp. 1–2. doi: 10.5582/bst.2020.01056
53. Srikantiah P., Charles M.D., Reagan S., Clark T.A., Pletz M.W., Patel P.R., Hoekstra R.M., Lingappa J., Jernigan J.A., Fischer M. SARS clinical features, United States, 2003. *Emerg. Infect. Dis.*, 2005, vol. 11, no. 1, pp. 135–138. doi: 10.3201/eid1101.040585
54. Tian S., Hu N., Lou J., Chen K., Kang X., Xiang Z., Chen H., Wang D., Liu N., Liu D., Chen G., Zhang Y., Li D., Li J., Lian H., Niu S., Zhang L., Zhang J. Characteristics of COVID-19 infection in Beijing. *J. Infect.*, 2020, vol. 80, no. 4, pp. 401–406. doi: 10.1016/j.jinf.2020.02.018
55. Tong Z.D., Tang A., Li K.F., Li P., Wang H.L., Yi J.P., Zhang Y.L., Yan J.B. Potential presymptomatic transmission of SARS-CoV-2, Zhejiang province, China, 2020. *Emerg. Infect. Dis.*, 2020, vol. 26, no. 5, pp. 1052–1054. doi: 10.3201/eid2605.200198
56. Tsang K.W., Ho P.L., Ooi G.C., Yee W.K., Wang T., Chan-Yeung M., Lam W.K., Seto W.H., Yam L.Y., Cheung T.M., Wong P.C., Lam B., Ip M.S., Chan J., Yuen K.Y., Lai K.N. A cluster of cases of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N. Engl. J. Med.*, 2003, vol. 348, no. 20, pp. 1977–85. doi: 10.1056/NEJMoa030666
57. Van Cuong L., Giang H.T.N., Linh L.K., Shah J., Van Sy L., Hung T.H., Reda A., Truong L.N., Tien D.X., Huy N.T. The first Vietnamese case of COVID-19 acquired from China. *Lancet Infect. Dis.*, 2020, vol. 20, no. 4, pp. 408–409. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30111-0
58. Velavan T.P., Meyer C.G. The C.O.V.I.D-19 epidemic. *Trop. Med. Int. Health*, 2020, vol. 25, no. 3, pp. 278–280. doi: 10.1111/tmi.13383

59. Wang C., Horby P.W., Hayden F.G., Gao G.F. A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet*, 2020, vol. 395, no. 10223, pp. 470–473. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30185-9
60. Wong J.E.L., Leo Y.S., Tan C.C. COVID-19 in Singapore-current experience: critical global issues that require attention and action. *JAMA*, 2020, vol. 323, no. 13, pp. 1243–1244. doi: 10.1001/jama.2020.2467
61. World Health Organization (WHO). Coronavirus disease 2019 (COVID-19) Situation Report-66. 2020. URL: [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200326-sitrep-66-covid-19.pdf?sfvrsn=9e5b8b48\\_2](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200326-sitrep-66-covid-19.pdf?sfvrsn=9e5b8b48_2)
62. Wu C., Liu Y., Yang Y., Zhang P., Zhong W., Wang Y., Wang Q., Xu Y., Li M., Li X., Zheng M., Chen L., Li H. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharm. Sin. B.*, 2020, vol. 10, no. 5, pp. 766–788. doi: 10.1016/j.apsb.2020.02.008
63. Wu J., Wu X., Zeng W., Guo D., Fang Z., Chen L., Huang H., Li C. Chest CT findings in patients with Coronavirus Disease 2019 and its relationship with clinical features. *Invest. Radiol.*, 2020, vol. 55, no. 5, pp. 257–261. doi: 10.1097/RLI.0000000000000670
64. Wu J.T., Leung K., Leung G.M. Nowcasting and forecasting the potential domestic and international spread of the 2019-nCoV outbreak originating in Wuhan, China: a modelling study. *Lancet*, 2020, vol. 395, no. 10225, pp. 689–697. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30260-9
65. Xu Y.H., Dong J.H., An W.M., Lv X.Y., Yin X.P., Zhang J.Z., Dong L., Ma X., Zhang H.J., Gao B.L. Clinical and computed tomographic imaging features of novel coronavirus pneumonia caused by SARS-CoV-2. *J. Infect.*, 2020, vol. 80, no. 4, pp. 394–400. doi: 10.1016/j.jinf.2020.02.017
66. Xu Z., Li S., Tian S., Li H., Kong L.Q. Full spectrum of COVID-19 severity still being depicted. *Lancet.*, 2020, vol. 395, no. 10228, pp. 947–948. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30308-1
67. Yang X., Yu Y., Xu J., Shu H., Xia J., Liu H., Wu Y., Zhang L., Yu Z., Fang M., Yu T., Wang Y., Pan S., Zou X., Yuan S., Shang Y. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir. Med.*, 2020, vol. 8, no. 5, pp. 475–481. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30079-5
68. Yang Y., Li W., Zhang Q., Zhang L., Cheung T., Xiang Y.T. Mental health services for older adults in China during the COVID-19 outbreak. *Lancet Psychiatry*, 2020, vol. 7, no. 4, e19. doi: 10.1016/S2215-0366(20)30079-1
69. Yang Y., Shang W., Rao X. Facing the COVID-19 outbreak: what should we know and what could we do? *J. Med. Virol.*, 2020, vol. 92, no. 6, pp. 536–537. doi: 10.1002/jmv.25720
70. Yin Y., Wunderink R.G. MERS, SARS and other coronaviruses as causes of pneumonia. *Respirology*, 2018, vol. 23, no. 2, pp. 130–137. doi: 10.1111/resp.13196
71. Zhang J.J., Dong X., Cao Y.Y., Yuan Y.D., Yang Y.B., Yan Y.Q., Akdis C.A., Gao Y.D. Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. *Allergy*, 2020, vol. 75, no. 7, pp. 1730–1741. doi: 10.1111/all.14238
72. Zhang S., Diao M., Yu W., Pei L., Lin Z., Chen D. Estimation of the reproductive number of novel coronavirus (COVID-19) and the probable outbreak size on the Diamond Princess cruise ship: a data-driven analysis. *Int. J. Infect. Dis.*, 2020, vol. 93, pp. 201–204. doi: 10.1016/j.ijid.2020.02.033
73. Zhang Y., Xu J., Li H., Cao B. A novel coronavirus (COVID-19) outbreak: a call for action. *Chest*, 2020, vol. 157, no. 4, pp. e99–e101. doi: 10.1016/j.chest.2020.02.014
74. Zhu Y., Chen L., Ji H., Xi M., Fang Y., Li Y. The risk and prevention of novel coronavirus pneumonia infections among inpatients in psychiatric hospitals. *Neurosci. Bull.*, 2020, vol. 36, no. 3, pp. 299–302. doi: 10.1007/s12264-020-00476-9

**Авторы:**

**Гоми Р.**, Исфahanский Университет медицинских наук, Исфahan, Иран;  
**Асгари Н.**, Исфahanский Университет медицинских наук, Исфahan, Иран;  
**Хаджихейдари А.**, Исфahanский Университет медицинских наук, Исфahan, Иран;  
**Эстеки Р.**, Исфahanский Университет медицинских наук, Исфahan, Иран;  
**Бийабанаки Ф.**, Исфahanский Университет медицинских наук, Исфahan, Иран;  
**Насиринасаб Ф.**, Исфahanский Университет медицинских наук, Исфahan, Иран.

**Authors:**

**Ghomi R.**, 9 Dey Manzariyeh Hospital, Isfahan University of medical science, Isfahan, Iran;  
**Asgari N.**, 9 Dey Manzariyeh Hospital, Isfahan University of medical science, Isfahan, Iran;  
**Hajihaydari A.**, 9 Dey Manzariyeh Hospital, Isfahan University of medical science, Isfahan, Iran;  
**Esteki R.**, 9 Dey Manzariyeh Hospital, Isfahan University of medical science, Isfahan, Iran;  
**Biyabanaki F.**, 9 Dey Manzariyeh Hospital, Isfahan University of medical science, Isfahan, Iran;  
**Nasirinasab F.**, 9 Dey Manzariyeh Hospital, Isfahan University of medical science, Isfahan, Iran.

Поступила в редакцию 12.06.2020  
 Принята к печати 31.08.2020

Received 12.06.2020  
 Accepted 31.08.2020

# STRONGYLOIDIASIS IN CLINICAL PRACTICE: CHALLENGES IN DIAGNOSTICS AND TREATMENT (BRIEF REVIEW AND CLINICAL OBSERVATIONS)

A.K. Tokmalaev<sup>a</sup>, G.M. Kozhevnikova<sup>a</sup>, V.D. Zavoikin<sup>b</sup>, N.I. Tumolskaya<sup>b</sup>,  
N.A. Polovinkina<sup>a</sup>, V.V. Konnov<sup>a</sup>, V.P. Golub<sup>a</sup>, T.V. Kharlamova<sup>a</sup>, K.C. Emerole<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** High priority of soil-transmitted helminths worldwide and in the Russian Federation is due to their vast distribution and the severe pathological features they induce in humans. Recently, it was observed that awareness of clinicians regarding this disease category was markedly decreased, although no significant decline of the disease occurrence has been recorded, whereas rate of imported cases of parasitic diseases including soil-transmitted helminths like strongyloidiasis mainly originating from subtropical or tropical countries rose in non-endemic regions. Lack of alertness on diseases like strongyloidiasis impedes timely diagnostics and treatment. Global prevalence of strongyloidiasis was estimated to range within 30–100 million people, however the World Health Organization (WHO) suggests that it was underestimated as precise data in endemic countries remain unknown. The occurrence of these helminths has been recorded in regions of temperate-continental climate: Western Ukraine, Belarus, Moldova, the Caucasus, Central Asia, as well as in Eastern Europe and the Mediterranean region. In the Russian Federation locally acquired infections are frequently recorded in the Krasnodar Territory and Rostov Region. Here, based on multi-year experience in management of patients with strongyloidiasis we present our data and brief review of publications and systematic literature related to the challenges of its clinical picture, diagnostics and treatment. Life cycle, basic biological parameters of free-living helminth in nature and distinctive features of autoinfection related to strongyloidiasis were reviewed. Special attention was paid to the risk of developing severe forms (hyperinfection and disseminated strongyloidiasis) especially in immunocompromised hosts: HIV infection, radiotherapy followed by chemotherapy, long-term corticosteroid use. Difficulties in diagnosing *Strongyloides stercoralis* infection are due to its polymorphic and non-specific clinical manifestations, as well as the lack of clinical knowledge and awareness about the disease. Clinical importance of parasitological methods for larvae detection was underlined. It was noted that the drug of choice in therapy of strongyloidiasis is ivermectin unapproved yet in Russia, whereas albendazole as an alternative drug exerts poorer efficacy, justifying a need to repeat treatment courses to establish full recovery from the disease.

**Key words:** strongyloidiasis, *Strongyloides stercoralis*, immunodeficiency, autoinfection, hyperinfection, disseminated strongyloidiasis, Baermann funnel technique, Ivermectin.

---

**Адрес для переписки:**

Харламова Татьяна Владимировна  
117198, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6,  
ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов.  
Тел.: 8 910 490-91-16.  
E-mail: tatykharlam@yandex.ru

**Contacts:**

Tatyana V. Kharlamova  
117198, Russian Federation, Moscow, Miklukho-Maklay str., 6,  
Peoples Friendship University of Russia (RUDN University).  
Phone: +7 910 490-91-16.  
E-mail: tatykharlam@yandex.ru

**Библиографическое описание:**

Токмалаев А.К., Кожевникова Г.М., Завойкин В.Д., Тумольская Н.И.,  
Половинкина Н.А., Коннов В.В., Голуб В.П., Харламова Т.В., Емероле К.С.  
Стронгилоидоз в клинической практике: вопросы диагностики и лечения  
(краткий обзор и клинические наблюдения) // Инфекция и иммунитет.  
2020. Т. 10, № 4. С. 664–670. doi: 10.15789/2220-7619-SIP-1224

**Citation:**

Tokmalaev A.K., Kozhevnikova G.M., Zavoikin V.D., Tumolskaya N.I.,  
Polovinkina N.A., Konnov V.V., Golub V.P., Kharlamova T.V., Emerole K.C.  
Strongyloidiasis in clinical practice: challenges in diagnostics and treatment  
(brief review and clinical observations) // Russian Journal of Infection  
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 4, pp. 664–670.  
doi: 10.15789/2220-7619-SIP-1224

## СТРОНГИЛОИДОЗ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ: ВОПРОСЫ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ (КРАТКИЙ ОБЗОР И КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ)

Токмалаев А.К.<sup>1</sup>, Кожевникова Г.М.<sup>1</sup>, Завойкин В.Д.<sup>2</sup>, Тумольская Н.И.<sup>2</sup>, Половинкина Н.А.<sup>1</sup>, Коннов В.В.<sup>1</sup>, Голуб В.П.<sup>1</sup>, Харламова Т.В.<sup>1</sup>, Емероле К.Ч.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

<sup>2</sup> Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

**Резюме.** Актуальность проблемы геогельминтозов, как в мире, так и в Российской Федерации, обусловлена их широким распространением и вызываемыми ими серьезными патологическими изменениями в организме человека. В последнее время наблюдается заметное снижение информированности практических врачей об этой категории болезней, хотя уровень заболеваемости в стране не снижается, а завоз паразитарных болезней, включая различные гельминтозы, в том числе стронгилоидоз, неуклонно нарастает. Слабая настороженность к этим болезням препятствует своевременной диагностике и лечению. В Российской Федерации стронгилоидоз относится к редким нозологическим формам (уровень заболеваемости не превышает 1,0 на 100 тыс. населения) и его регистрируют в общей строке «другие гельминтозы». Наряду с регионами с тропическим и субтропическим климатом ареалы распространения этого гельминта существуют в районах с умеренным климатом: в западных областях Украины, Белоруссии, Молдове, на Кавказе и в Средней Азии, а также в Восточной Европе и Средиземноморском регионе. В РФ случаи местного заражения чаще регистрируются в Краснодарском крае и Ростовской области. Авторы, имеющие многолетний опыт ведения больных стронгилоидозом, представили анализ собственных наблюдений и краткий обзор современной научной и методической литературы по проблемам клиники, диагностики и лечения гельминтоза. Рассмотрены особенности биологии возбудителя — *Strongyloides stercoralis*: наличие в жизненном цикле свободноживущих в природе и паразитирующих в организме человека взрослых гельминтов, возможность аутоинвазии, из-за которой болезнь длится годами и не завершается выздоровлением. Обращено внимание на существенные изменения в клинике гельминтоза на современном этапе, в том числе в сторону тяжелых форм (гиперинвазивный и генерализованный стронгилоидоз), что обусловлено распространением состояния иммунодефицита у людей (ВИЧ/СПИД, широкое применение ГКС и по другим причинам). Трудности клинической диагностики, частые ошибки в первичном диагнозе объясняются как полиморфизмом клиники данного гельминтоза, так и недостаточной информированностью практических врачей о стронгилоидозе. В диагностике отмечено ведущее значение паразитологических методов, направленных на обнаружение личинок (но не яиц) гельминта. Указано, что средством выбора для лечения является известный антигельминтный препарат «Ивермектин», который в РФ не зарегистрирован. В практике для этих целей используется «Албендазол», который недостаточно эффективен, поэтому, как правило, возникает необходимость проведения повторных циклов лечения.

**Ключевые слова:** стронгилоидоз, *Strongyloides stercoralis*, иммунодефицит, аутоинвазия, гиперинвазия, генерализованный стронгилоидоз, воронковый метод Бермана, «Ивермектин».

The public health and clinical significance of soil-transmitted helminths worldwide and in the Russian Federation is due to their vast distribution and the severe pathological features they induce in humans. Recent observation has indicated lack of awareness among clinicians regarding this disease category, although no significant decline of the disease occurrence has been recorded. Imported cases of parasitic diseases including soil-transmitted helminths like strongyloidiasis which mostly originate from countries in subtropical or tropical regions are increasing in non-endemic regions. Lack of information and awareness about diseases like strongyloidiasis impedes prompt diagnosis and treatment. Worldwide prevalence of strongyloidiasis has long been estimated to be between 30 and 100 million people, however the World Health Organization (WHO) suggest that this is an underestimation as precise data on prevalence are unknown in endemic countries [6, 9, 15, 23].

In the Russian Federation strongyloidiasis is considered a rare disease, (the incidence rate does not exceed 1 case per 100,000 population) therefore it is classified as «other helminthiasis». The occurrence

of these helminths has been recorded in regions of temperate-continental climate: Western Ukraine, Belarus, Moldova, the Caucasus, Central Asia, as well as in Eastern Europe and the Mediterranean region. In the Russian Federation locally acquired infections are frequently recorded in the Krasnodar Territory and Rostov Region [2, 13, 14].

Strongyloidiasis is characterized by several features in the pathogenesis and clinical course. Immunocompromised individuals such as human immunodeficiency virus infection (HIV infection) are the most vulnerable population at risk for developing life-threatening clinical syndromes associated with the disease [4, 6, 10, 11, 22].

Strongyloidiasis is caused by 2 species of the intestinal nematode *Strongyloides*. The most common and globally distributed human pathogen of clinical importance is *Strongyloides stercoralis*, *S. fuelleborni* occurs exclusively in humans in Africa and New Papua Guinea. *S. stercoralis* (intestinal nematode) — is a dioecious parasite that belongs to the genus of parasitic nematodes. The disease was first recognized in 1876 by the French physician Louis

Alexis Normand. He had tested stool specimens taken from French troops suffering from severe, persistent diarrhea who had returned from Cochinchina (Vietnam). The disease was known for many years as “Cochinchina diarrhea” [14, 22].

*Strongyloides stercoralis* is a soil-transmitted helminth with a more complex life cycle than that of most nematodes because it alternates between free-living cycle of development in the soil and parasitic life cycle in humans. The life cycle of *S. stercoralis* is basically composed of adult worms, rhabditiform larvae and filariform larvae (filaria). Adult female worms embed in the small intestinal mucosa (sometimes in the pancreatic duct, biliary tract and crypts of Lieberkühn). Female adult worms that burrow into the submucosa of the small bowel asexually produce eggs. The eggs hatch into rhabditiform larvae, which are released into the lumen of the intestine and are excreted along with stool, into the environment (soil and water) later transforming into filariform. In the regions of warm and humid climate, larval development of parasites in the environment to the invasive stage occurs in all seasons of the year unlike in regions of temperate-continental climate. The filariform larvae then can penetrate the skin of a human host to begin the second life cycle, called the parasitic cycle, or direct cycle. After penetration, the filariform larvae enter the venous circulation, and are transported to the lungs invading the alveolar spaces. They then migrate from the bronchial tree to the pharynx, are swallowed, and end up in the small intestine. In the intestine, they molt twice and become adult female worms which produce eggs that develop into rhabditiform larvae. *S. stercoralis* is unique among intestinal nematodes in its ability to complete its life cycle within the host through an asexual autoinfective cycle, allowing the infection to persist in the host indefinitely. In autoinfection some rhabditiform larvae transform into invasive filariform larvae before being excreted. As such, they are capable of reinfesting the host by invading the intestinal wall or the perianal skin. Under some conditions associated with immunosuppression or underlying gastrointestinal disorders (constipation, diverticulitis) this autoinfective cycle can become amplified into a potentially fatal hyperinfection syndrome, characterized by severe complications. There is evidence implicating the sexual transmission of *Strongyloides stercoralis* among homosexual men. It is important to note that laboratory safety measures mandated at most institutions are necessary to protect against infection with *S. stercoralis* [4, 6, 14, 19].

In the early stage of the disease, pathological changes in tissues and organs are due to the host to the activity and metabolic products of the parasite. Migration of the filariform larvae from the intestine into the portal vein system and then the pulmonary circulatory system may lead to the development of bronchopneumonia, asthmatic bronchitis, and eosinophilic pulmonary infiltrates. The parasite reach-

es the intestine 20–30 days after the initial infection. Invasion of the intestine is accompanied by its mucosal damage, hemorrhage, eosinophil infiltration, erosion, and often ulcers. Granulomas of various organs (gastric, liver, intestinal) may be observed. Chronicity induces intestinal mucosal atrophy and malabsorption of fats and carbohydrates. Protein-losing enteropathy may result in hypoproteinemia leading to nutritional deficiency and cachexia. Most often immunocompetent individuals infected by *S. stercoralis* may remain asymptomatic for a long period, but a change in immune status can increase the parasite burden leading to disease manifestation, hyperinfection syndrome and disseminated infection especially in immunocompromised individuals.

The term hyperinfection is used to denote autoinfection, a phenomenon in which the number of worms increases tremendously leading to dissemination. Disseminated disease is defined by the presence of parasites outside of the traditional life cycle (i.e. in organs other than the skin, GI tract, or lungs). Patients with suppressed immunity due to corticosteroids therapy or associated with HIV infection can develop a severe disseminated form. Disseminated strongyloidiasis involves widespread dissemination of larvae outside of the gut and lungs, often involving the liver, brain, heart, and urinary tract, pancreas and central nervous system. In such severe cases which results in severe damage to the intestinal wall due to a high parasite burden, about 50% of patients with disseminated strongyloidiasis are prone to develop polymicrobial bacteremia often complicated by meningitis [4, 6, 10, 11, 20, 22].

Strongyloidiasis is classified under the diagnosis code ICD-10: B78 which highlights:

- Intestinal strongyloidiasis (B78.0);
- Cutaneous strongyloidiasis (B78.1);
- Disseminated strongyloidiasis (V78.7);
- Unspecified strongyloidiasis (B78.9).

The exact incubation period is not known. The early larval migration phase, which occurs during percutaneous infection, lasts up to 10 days. The manifestation reflects the migration of the parasite within the host. Penetration of the skin by filariform larvae may result in the development of a pruritic, papular, erythematous rash. Cough, shortness of breath, wheezing, and fever may develop as the larvae pass through the lungs. In the late phase, when the parasite reaches reproductive maturity and invades the intestine, the clinical manifestations of the disease are associated with damage to the digestive system. In the absence of treatment and possibility of autoinfection, helminthiasis becomes chronic, lasting for years and decades.

Some of these chronic infections have lasted over 30 years as a result of autoinfection.

Patients with mild forms of strongyloidiasis usually present with nausea and epigastric pain.

Stool consistency is unchanged, although constipation or diarrhea can develop. Nausea, sometimes

accompanied by vomiting, is noted especially in severe signs of the disease. Severe signs also include intense epigastric pain or diffuse abdominal pain, while diarrhea persists for 5–7 days. Patients may present with 15 or more loose or watery stools per day, with signs of dehydration. Passage of bloody stools with mucus is not uncommon in strongyloidiasis. Neurological manifestations associated with strongyloidiasis include headache, dizziness, fatigue and irritability.

Severe allergic syndrome is characterized by persistent recurrent urticaria, itchy skin, myalgia and arthralgia. Eosinophilic myocarditis and asthmatic bronchitis are detected in some patients. Ocular disorders like conjunctivitis, angioretinopathy, inflammatory macular diseases and corneal ulcers has been recorded

Hyperinfection is characterized by severe gastrointestinal and pulmonary manifestations; cramping abdominal pain, watery diarrhoea, weight loss, nausea, vomiting and occasionally gastrointestinal bleeding, asthma-like symptoms such as cough and wheezing, and others such as pneumonia and pulmonary haemorrhage with diffuse bilateral infiltrates on the chest X-ray. CNS involvement (parasitic and bacterial meningitis) and gram-negative sepsis in strongyloidiasis has only been seen in patients with hyperinfection and may be fatal.

Disseminated strongyloidiasis are most frequently associated with subclinical infection in an immunocompromised host. In disseminated strongyloidiasis the larvae invade numerous organs (intestines, lungs, liver, etc.). Immune disorders often disguise typical manifestations of helminthiasis leading to delayed diagnosis and adequate treatment of the disease. Eosinophilia and allergic reactions which are unique among helminths are usually mild or absent.

Complications such as ulcerative intestinal lesions and perforated peritonitis are recorded are associated with strongyloidiasis. It should be noted that existing treatments can provoke inflammatory responses probably due to an immune response to the dead parasites, thus the above complications could be as a result of antiparasitic medication.

Bowel obstruction, appendicitis, pancreatitis, malabsorption are rare complications of *S. stercoralis* infection. In disseminated strongyloidiasis and severe hyperinfection, the mortality rate can be as high as 80% [9, 18, 21, 22].

The clinical presentation of chronic and acute strongyloidiasis varies from asymptomatic infection, mild symptomatic and severe form [1, 4, 6, 8, 11, 14].

Based on 34 clinical observations, our data revealed 11 mild cases, 21 moderate and 2 severe forms of *S. stercoralis* infection induced by hyperinfection syndrome and disseminated strongyloidiasis. Acute onset of the disease was observed only in 8 patients while a mild onset was frequently recorded.

**Case study 1:** A 54 years old (y/o) man presents for routine check-up evaluation. He had no chief complaints on examination. There were no skin le-

sions and no organ enlargement was noted. Vital signs are as follows: Blood Pressure 130/80mmHg; Heart Rate 78/minute and regular; Respiratory Rate 18/minute. Lungs were clear to auscultation bilaterally and normal S1 and S2 sounds were heard with regular rate and rhythm. Bowel movement and urine output were normal. His complete blood count was only significant for eosinophilia (13%). He has a history of myocardial infarction and diabetes. He resides in Moscow Region in an apartment and his travel history includes: Australia, Kenya, Kamchatka, Mordovia, Sochi (Southern Russia). A study was conducted to find out the prevalence of any enteric parasites in stool. Results indicated the presence of a low intensity of *S. stercoralis* infection. Examination of stool sediment revealed only 1 rhabditiform larva.

In the presented clinical case, the only significant finding was blood eosinophilia. It should be noted that a rise in the eosinophils is common only among recently infected patients [1, 7, 14].

In acute strongyloidiasis, the manifestation produces a symptom complex of an acute infectious-allergic presentation within the skin, along with disorders of the gastrointestinal tract, as mentioned above. After 2–3 months, the above symptoms subside, and the disease becomes chronic, characterized by polymorphism of clinical manifestations [4, 6, 7, 9, 14, 22].

**Case study 2:** A 47 y/o patient presents with symptoms of nausea, pain in the right and left hypochondriac region, pruritus, and diarrhoea up to 7 times daily. The patient considers himself ill for about 4 years. He has a history of chronic cholecystitis and he has been under constant observation at a gastroenterologist. He was treated without any positive outcome. His travel history includes: multiple visits to China, the Dominican Republic, as well Krasnodar Territory of the Russian Federation. Blood count indicated an eosinophil level of 5.2%, other indicators were not significant. Examination of stool sediment revealed 2 larvae of *S. stercoralis*. Considering his travel history, clinical manifestations and laboratory findings, the patient was diagnosed with intestinal strongyloidiasis.

The described case illustrates by the chronic course of strongyloidiasis with a polymorphic clinical presentation: gastrointestinal disorders (chronic diarrhea and symptoms of dyspepsia) and allergic manifestations.

In severe forms, prolonged diarrhoea syndrome is common, leading to dehydration, malabsorption, anaemia and cachexia. There are possibilities of ulcerative intestinal lesions, parenchymal liver degeneration and pancreatitis

**Case study 3:** A 48 y/o man presents with the history of chronic diarrhoea up to 8 times daily for five years. He resides in Baku Azerbaijan and constantly visits rural areas of the country. The patient has lost nearly 20 kg of body weight. He has been under observation at the Institute of Gastroenterology, Moscow, and was diagnosed to have chronic enteri-

tis. Following treatment, a short-term improvement was noted. Subsequently, diarrhoea and weight loss resumed. The following year he was admitted to the hospital for a history of chronic diarrhoea. Small bowel biopsy was performed and histological examination revealed inflammation response due to eosinophils, a helminth larva, presumably the larva of *S. stercoralis*. Parasitological method based on the Baermann funnel technique was used to uncover a large number of *S. stercoralis* larvae. Complete blood count revealed high eosinophil levels: 12–18%. The diagnosis of *Strongyloides stercoralis* hyperinfection was made based on the results obtained.

As mentioned above, immunocompromised patients (HIV infection, radiotherapy followed by chemotherapy, patients on long term corticosteroids use), has unfavourable prognosis as penetration of the larvae is observed not only into the targeted organs (guts and lungs). Brain involvement may lead to venous thrombosis, cerebral oedema and rapid death of the patient. Strongyloidiasis is considered an opportunistic parasitic infection in HIV [4, 6, 10, 17, 21].

It is difficult to make a differential diagnosis of strongyloidiasis based on clinical symptoms due to its polymorphism. Cases of diagnostic errors of were discovered in most of our patients. It was frequently misdiagnosed for cases like food poisoning, bacterial gastroenteritis, unspecified enterocolitis, duodenal ulcer, pancreatitis, biliary dyskinesia, eosinophilic pneumonia and in some cases typhoidal salmonella disease [7, 14]. Lately diseases that conceal the infection are becoming common: Acute leukaemia, malignant neoplasms, Crohn's disease, Whipple syndrome, traveller's diarrhoea [12, 16]. Strongyloidiasis should be differentiated from other helminth infections that have an acute phase in their clinical course (hookworm, ascariasis, schistosomiasis, opisthorchiasis, fascioliasis, clonorchiasis, trichinosis) [4, 6, 11].

We report a differential diagnosis case report on a 21 years old patient (female) who returned from Thailand with chief complaints of abdominal discomfort and loose stool. The patient presented to a gastroenterologist with these complaints who drew attention to mild eosinophilia (12%) in her blood count.

Suspected helminth infection prompted the doctor to perform series of serological test and high levels of antibodies to echinococcus were detected. The patient was consulted by an infectious disease (ID) specialist. Further epidemiological, clinical and laboratory data were collected, however human echinococcosis was not confirmed. Subsequent results demonstrated 55% eosinophilia, moderate leukocytosis and anaemia (99 g/L). The patient stated that she had noticed an itchy rash on the tops of her feet and legs while in Thailand. Considering the patient's clinical manifestation, travel history and laboratory findings she was likely to acquire an infection by a geohelminth pathogen. Ancylostoma eggs were identified using

Baermann funnel technique. She was diagnosed with Hookworm infection (Ancylostomiasis) and treatment with albendazole was initiated. The management of the patient was carried out in accordance with the Clinical Guidelines for Management of Patients with Hookworm infection. Follow up of hematological parameters indicated normal values. This case illustrates similar acute infection of geohelminths, the low specificity of serological tests and the importance of constantly investigating pathogens using adequate parasitological methods like the Baermann funnel technique [2, 3, 5, 6, 16].

It is important to highlight that patients with strongyloidiasis might present with normal white blood cells (WBC) or moderate leukocytosis. Other possible findings include; Low platelets count, slightly increased ESR, hypochromic anaemia especially in chronic forms. Coprology test reveals a significant amount of muscle fibres and WBC. Besides the stool and duodenal contents, Strongyloides larvae can be detected in the sputum, urine and vomitus of an infected individual [3, 5, 6, 11, 16].

The most convenient and widely used method for diagnosing strongyloidiasis is the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), although specificity may decrease as a result of cross-reactivity with other parasite antigens. Immunological tests have been used primarily as auxiliary methods in combination with clinical laboratory and instrumental techniques. Polymerase chain reaction (PCR) has not been suitable for screening purpose in practice [6, 22].

Medical treatment should be achieved in all cases even in the absence of symptoms to prevent parasite dissemination. Unfortunately, a spontaneous cure is impossible due to the possibility of autoinfection [6, 11, 14, 22]. The drug of choice for acute, chronic, hyperinfection and disseminated strongyloidiasis is Ivermectin (stromectol and mectizan available in 3-mg and 6-mg tablets respectively) [22].

Ivermectin is taken as two single 200 mg/kg doses administered on two consecutive days for adults. Recommended dosage for children aged < 2 years is 200 mg daily for two days. Some individuals may require a repeated course of treatment if necessary. Ivermectin has been included in the WHO list of essential medicines since 2017. Ivermectin remains unregistered in the Russian Federation. Albendazole is a reasonable alternative although cure rates in clinical trials were inferior to Ivermectin. Albendazole is generally taken as a single dose or two single doses of 400 mg/800 mg (after meals) for 3 days. Antihistamines should be considered while on antihelminthic medications. Because of the risk of hyperinfection and/or disseminated disease corticosteroids must be avoided [4, 6, 11]. The management of the diseases is determined by the severity of and complications [13].

Follow-up stool tests (3 times with an interval of 1–2 days) are recommended immediately af-

ter and one month after the course of medication to determine the effectiveness of therapy. The lesser the fecal test control, the higher the chances (70%) of false negative results. It is important to note that duodenal aspirate is more sensitive than stool examination. Therefore, when in doubt it is advisable to perform a test on the duodenal contents [4, 6, 13]. The criteria for cure are reached when symptoms finally cease with the disappearance of the parasites from the feces and/or duodenal aspirate.

Strongyloidiasis carries a relatively good prognosis except in severe forms of the disease and immunodeficiency cases which predispose individuals to severe strongyloidiasis [4, 6, 10, 11, 22].

A unifying diagnosis for strongyloidiasis cannot be certain due to its polymorphism and non-speci-

ficity of its clinical manifestations. Other factors like the lack of clinician knowledge about the disease and the high importance to implement diagnostic approaches like the use of specific methods, intended for detection of helminth larvae (Baermann technique and its modifications) have a huge impact in disease control. Ivermectin is unlicensed in the Russian Federation and albendazole which serves as the alternative is as least as effective. Therefore, it is mandatory to initiate a repeated course of Albendazole after the initial course is completed in order to establish full recovery from the disease. Considering the global prevalence of Strongyloides infection, the increase in net migration and tourism from affected regions, the disease remains relevant in clinical practice.

## References

1. Бронштейн А.М., Федянина Л.В., Малышев Н.А., Лашин В.М., Бурова С.В., Давыдова И.В., Максимова М.С., Соколова А.В. Острый и хронический стронгилоидоз у российских туристов, посетивших Тайланд, Черноморское побережье Краснодарского края и Абхазии: проблемы диагностики и лечения. Анализ случаев и обзор литературы // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2017. Т. 22, № 3. С. 156–161. [Bronstein A.M., Fedyanina L.V., Malyshev N.A., Lashin V.M., Burova S.V., Davydova I.V., Maksimova M.S., Sokolova A.V. Acute and chronic strongyloidiasis in Russian tourists travelled to Thailand, the coast of Black sea in Russia and Abkhazia: problems of diagnosis and treatment. Analysis of cases and review. *Epidemiologiya i infektionnykh boleznei = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2017, vol. 22, no. 3, pp. 156–161. doi: 10.18821/1560-9529-2017-156-161 (In Russ.)]
2. Головченко Н.В., Ермакова Л.А., Пшеничная Н.Ю., Костенич О.Б., Киосова Ю.В., Журавлев А.С. Клинико-эпидемиологические особенности инвазии Strongyloides stercoralis в Ростовской области // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2018. Т. 7, № 4. С.25–28 [Golovchenko N.V., Ermakova L.A., Pshenichnaya N.Yu., Kostenich O.B., Kiosova Yu.V., Zhuravlev A.S. Clinical and epidemiological features of the invasion of Strongyloides stercoralis in the Rostov Region. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie = Infectious Diseases: News, Opinions, Training*, 2018, vol. 7, no. 4. pp. 25–28. doi: 10.24411/2305-3496-2018-14003 (In Russ.)]
3. Ершова И.Б., Осычнок Л.М., Мочалова А.А. Методы диагностики гельминтозов на современном этапе // Актуальная инфектология. 2014. Т. 2, № 3. С. 86–89. [Ershova I.B., Osychnok L.M., Mochalova A.A. Methods of helminthiasis diagnosis at the present stage. *Aktual'naya infektologiya = Actual Infectology*, 2014, vol. 2, no. 3, pp. 86–89. (In Russ.)]
4. Инфекционные болезни: национальное руководство. Под ред. Н.Д. Ющука, Ю.Я. Венгерова. 2-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. 1104 с. [Infectious diseases: national guidelines. Eds. Yushchuk N.D., Vengerov Yu.Ya. Moscow: GEOTAR-Media, 2019. 1104 p. (In Russ.)]
5. Лабораторная диагностика гельминтозов и протозоозов. Методические указания МУК 4.2.3145-13. Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014. [Laboratory diagnostics of helminthiasis and protozoa. Methodical instructions MUK 4.2.3145-13. Federal Center of Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor, 2014. (In Russ.)]
6. Паразитарные болезни человека (протозоозы и гельминтозы): Руководство для врачей. Под ред. В.П. Сергиева, Ю.В. Лобзина, С.С. Козлова. СПб.: Издательство «Фолиант», 2016. 640 с. [Human parasitic diseases (protozoosis and helminthiasis): a guide for physicians. Eds. Sergiev V.P., Lobzin Yu.V., Kozlov S.S. St. Petersburg: Publishing House "Foliant", 2016. 640 p. (In Russ.)]
7. Полозок Е.С., Токмалаев А.К. О клинике и диагностике стронгилоидоза. Советская медицина. 1978. Т. 5. С. 120–132. [Polozok E.S., Tokmalaev A.K. About the clinic and diagnosis of strongyloidosis. *Sovetskaya meditsina = Soviet Medicine*, 1978, vol. 5, pp. 120–132. (In Russ.)]
8. Полякова В.Е., Иванова И.А., Полякова Н.Р., Воробьева М.Л., Полякова Н.В., Ромих В.В. Стронгилоидоз у детей. Педиатрия. 2015. Т. 94, № 5. С. 120–126. [Polyakova E.V., Ivanova I.A., Polyakova N.R., Vorobyeva L.M., Polyakova N.V., Romikh V.V. Strongyloidiasis in children. *Pediatriya = Pediatrics*, 2015, vol. 94, no. 5, pp. 120–126. (In Russ.)]
9. Сергиев В.П., Юшук Н.Д., Венгерова Ю.Я., Завойкин В.Д. Тропические болезни. Пособие для врачей. М.: БИНОМ, 2015. 636 с. [Sergiev V.P., Yushchuk N.D., Vengerov Yu.Ya., Zavoykin V.D. Tropical diseases. Manual for Physicians. Moscow: BINOM, 2015. 636 p. (In Russ.)]
10. Токмалаев А.К., Кожевникова Г.М. Инфекционные и паразитарные болезни у ВИЧ-позитивных лиц. М.: РУДН, 2012. 280 с. [Tokmalaev A.K., Kozhevnikova G.M. Infectious and parasitic diseases in HIV-positive individuals. Moscow: RUDN, 2012. 280 p. (In Russ.)]
11. Токмалаев А.К., Кожевникова Г.М. Клиническая паразитология. Протозоозы и гельминтозы. М.: Медицинское информационное агентство. 2017. 392 с. [Tokmalaev A.K., Kozhevnikova G.M. Clinical Parasitology. Protozoa and helminthiasis. Moscow: Medical News Agency, 2017. 392 p. (In Russ.)]
12. Тумольская Н.И., Голованова Н.Ю., Мазманян М.В., Завойкин В.Д. Клинические маски паразитарных болезней. Инфекционные болезни: новости, мнение, обучение. 2014. № 1. С. 17–27 [Tumolskaya N.I., Golovanova N.Yu.,

- Mazmanyany M.V., Zavoykin V.D. The clinical masks of parasitic diseases. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie = Infectious Diseases: News, Opinions, Training, 2014, vol. 1, pp. 17–27. (In Russ.)*
13. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Письмо о заболеваемости геогельминтозами в РФ в 2015 № 01/13265-16-27 от 03.10.2016. [Federal service for supervision of consumer rights protection and human well-being. Letter on incidence of geohelminthiasis in Russia in 2015 No. 01/13265-16-27 from 03.10.2016]. URL: <http://docs.cntd.ru/document/420382145>
  14. Шабловская Е.А. Стронгилоидоз М.: Медицина, 1986. 128 с. [Shablovskaya E.A. Strongyloidiasis. Moscow: Medicine, 1986. 128 p. (In Russ.)]
  15. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention. Parasites — Strongyloides, 2016. URL: [https://www.cdc.gov/parasites/strongyloides/health\\_professionals/index.html](https://www.cdc.gov/parasites/strongyloides/health_professionals/index.html) (13.03.2018)
  16. Bronshteyn A.M., Malyshev N.A. Traveller's diarrhea caused by ankylostomiasis in a Russia's tourist who has visited Thailand. *Epidemiology and Infection, 2009, vol. 3, pp. 35–37.*
  17. Natrajan K., Medisetty M., Gawali R., Tambolkar A., Patel D., Thorat V., Dubale N., Khirid V., Saraf C., Dravid A. Strongyloidosis hyperinfection syndrome in an HIV-infected patient: a rare manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome. *Case Reports in Infectious Diseases, vol. 2018: 6870768, 4 p. doi: 10.1155/2018/6870768*
  18. Keiser P.B., Nutman T.B. Strongyloides stercoralis in the immunocompromised population. *Clin. Microbiol. Rev., 2004, vol. 17, no. 1, pp. 208–217. doi: 10.1128/cmr.17.1.208-217.2004*
  19. Merman E., Siddha S., Keystone J.S., Habet A. Cutaneous Strongyloides infection postchemotherapy. *J. Cutan. Med. Surg., 2016, vol. 20, pp. 337–339. doi: 10.1177/1203475416633693*
  20. Ting-ting Q., Yang Q., Yu M.-H., Wang J. A fatal strongyloides stercoralis hyperinfection syndrome in a patient with chronic kidney disease. A case report and literature review. *Medicine (Baltimore), 2016, vol. 95, no. 19: 3638. doi: 10.1097/MD.0000000000003638*
  21. Woll F., Gotuzzo E., Montes M. Strongyloides stercoralis infection complicating the central nervous system. *Handbook of Clinical Neurology, 2013, vol. 114, pp. 229–234. doi: 10.1016/B978-0-444-53490-3.00017-0*
  22. World Gastroenterology Organisation: Global practical recommendations of the World Gastroenterology Organization. The management of strongyloidiasis. February 2018. URL: <https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/global-guidelines/management-of-strongyloidiasis>
  23. World Health Organization. Soil-transmitted helminth infections. Geneva: World Health Organization, 2017. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/soil-transmitted-helminth-infections> (13.03.2018)

**Авторы:**

**Токмалаев А.К.**, д.м.н., профессор, профессор кафедры инфекционных болезней с курсами эпидемиологии и фтизиатрии ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов, Москва, Россия;

**Кожевникова Г.М.**, д.м.н., профессор, зав. кафедрой инфекционных болезней с курсами эпидемиологии и фтизиатрии ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов, Москва, Россия;

**Завойкин В.Д.**, д.м.н., профессор, зав. клиническим отделением медицинской паразитологии и тропической медицины Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, Москва, Россия;

**Тумольская Н.И.**, д.м.н., профессор клинического отделения медицинской паразитологии и тропической медицины Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, Москва, Россия;

**Половинкина Н.А.**, к.м.н., доцент кафедры инфекционных болезней с курсами эпидемиологии и фтизиатрии ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов, Москва, Россия;

**Коннов В.В.**, ассистент кафедры инфекционных болезней с курсами эпидемиологии и фтизиатрии ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов, Москва, Россия;

**Голуб В.П.**, к.м.н., доцент кафедры инфекционных болезней с курсами эпидемиологии и фтизиатрии ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов, Москва, Россия;

**Харламова Т.В.**, к.м.н., ассистент кафедры инфекционных болезней с курсами эпидемиологии и фтизиатрии ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов, Москва, Россия;

**Емероле К.С.**, к.м.н., ассистент кафедры инфекционных болезней с курсами эпидемиологии и фтизиатрии ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов, Москва, Россия.

**Authors:**

**Tokmalaev A.K.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Infectious Diseases with Courses of Epidemiology and Phthisiology, Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russian Federation;

**Kozhevnikova G.M.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Department Infectious Diseases with Courses of Epidemiology and Phthisiology, Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russian Federation;

**Zavoikin V.D.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Medical Parasitology and Tropical Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

**Tumolskaya N.I.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Medical Parasitology and Tropical Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

**Polovinkina N.A.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Infectious Diseases with Courses of Epidemiology and Phthisiology, Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russian Federation;

**Konnov V.V.**, Assistant Professor, Department of Infectious Diseases with Courses of Epidemiology and Phthisiology, Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russian Federation;

**Golub V.P.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Infectious Diseases with Courses of Epidemiology and Phthisiology, Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russian Federation;

**Kharlamova T.V.**, PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Infectious Diseases with Courses of Epidemiology and Phthisiology, Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russian Federation;

**Emerole K.C.**, PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Infectious Diseases with Courses of Epidemiology and Phthisiology, Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 17.06.2019  
Отправлена на доработку 11.11.2019  
Принята к печати 14.03.2020

Received 17.06.2019  
Revision received 11.11.2019  
Accepted 14.03.2020

# САЛЬМОНЕЛЛА-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ КЛЮЧЕВЫХ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ БАКТЕРИЙ ВЛИЯЮТ НА ТРАНСКРИПЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ *Foxp3* И *RORγt* В КИШЕЧНО-АССОЦИИРОВАННОЙ ЛИМФОИДНОЙ ТКАНИ КРЫС

Ю.В. Букина<sup>1</sup>, Л.Я. Федонюк<sup>2</sup>, Г.Д. Коваль<sup>3</sup>, Ю.А. Шеховцева<sup>4</sup>, А.М. Камышный<sup>1</sup>, А.А. Губарь<sup>1</sup>, В.А. Губка<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Запорожский государственный медицинский университет, г. Запорожье, Украина

<sup>2</sup> Тернопольский государственный медицинский университет, г. Тернополь, Украина

<sup>3</sup> Буковинский государственный медицинский университет, г. Черновцы, Украина

<sup>4</sup> Харьковский национальный медицинский университет, г. Харьков, Украина

**Резюме.** Кишечный микробиом участвует во многих физиологических процессах хозяина, способствует формированию и поддержанию иммунного гомеостаза за счет регуляции иммунных реакций, направленных на защиту от колонизации патогенами. Особую роль в дифференцировке различных субпопуляций Т-лимфоцитов играют сегментарные нитевидные бактерии (*Segmented filamentous bacteria*, SFB), способные индуцировать в кишечечно-ассоциированной лимфоидной ткани (КАЛТ) дифференцировку провоспалительных Th17-клеток, а представители рода *Clostridium* (cluster IV и XIVa) и *Bacteroides fragilis* (полисахарид А [PSA]) стимулируют образование Т-регуляторных клеток (Treg) и продукцию супрессорного цитокина IL-10. Важными метаболитами *B. fragilis* являются короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), которые способны активировать клетки КАЛТ через рецептор FFAR2. Уменьшение концентрации КЦЖК снижает численность Treg в кишечнике и нарушает баланс Th17/Treg. Эти изменения напрямую ведут к снижению уровня мРНК *FFAR2*, *Foxp3* и повышению экспрессии *RORγt* в КАЛТ. Поэтому целью работы было определить уровень ключевых иммунорегуляторных бактерий в пристеночной микрофлоре кишечника крыс и его влияние на транскрипционную активность генов *Foxp3* и *RORγt* в КАЛТ при сальмонелла-индуцированном воспалении и на фоне введения ванкомицина и *B. fragilis*. Для определения родовой и видовой принадлежности бактерий, а также их количества в микрофлоре крыс применяли метод полимеразной цепной реакции (ПЦР-РВ) с идентификацией их по генам 16S rDNA. Для изучения транскрипционной активности генов использовали метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЛР). В ходе эксперимен-

## Адрес для переписки:

Букина Юлия Вячеславовна  
69035, Украина, Запорожье, пр. Маяковского, 26,  
Запорожский государственный медицинский университет.  
Тел.: +38 096 400-46-26; +38 095 512-09-29.  
E-mail: lingvus25@gmail.com

## Contacts:

Yuliia V. Bukina  
69035, Ukraine, Zaporozhye, pr. Majakovskogo, 26,  
Zaporozhye State Medical University.  
Phone: +38 096 400-46-26; +38 095 512-09-29.  
E-mail: lingvus25@gmail.com

## Библиографическое описание:

Букина Ю.В., Федонюк Л.Я., Коваль Г.Д., Шеховцева Ю.А., Камышный А.М., Губарь А.А., Губка В.А. Сальмонелла-индуцированные изменения уровня ключевых иммунорегуляторных бактерий влияют на транскрипционную активность генов *Foxp3* и *RORγt* в кишечечно-ассоциированной лимфоидной ткани крыс // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 4. С. 671–685. doi: 10.15789/2220-7619-SIC-1151

## Citation:

Bukina Yu.V., Fedoniuk L.Ya., Koval G.D., Shekhovtsova Iu.O., Kamyshnyi A.M., Gubar A.O., Gubka V.O. Salmonella-induced changes in the level of key immunoregulatory bacteria affect the transcriptional activity of the *Foxp3* and *RORγt* genes in the gut-associated lymphoid tissue of rats // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 4, pp. 671–685. doi: 10.15789/2220-7619-SIC-1151

та при введении животным ванкомицина и сальмонелл наблюдалось увеличение уровня SFB и уменьшение *A. muciniphila*, *F. prausnitzii*. Также при инфицировании крыс *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* на фоне предобработки ванкомицином отмечалось возрастание численности SFB на фоне выраженного уменьшения *Bacteroides–Prevotella* group, *A. muciniphila*, *Clostridium* spp. кластеров XIV, IV и *F. prausnitzii*, что приводило к уменьшению уровня экспрессии мРНК генов *Foxp3*<sup>+</sup> и увеличению *RORγt*<sup>+</sup> соответственно. Однако введение *B. fragilis* животным, получавшим *S. Enteritidis* или *S. Typhimurium* на фоне предобработки ванкомицином, обуславливало уменьшение уровня SFB и мРНК *RORγt*<sup>+</sup> и, наоборот, увеличивало численность *Bacteroides–Prevotella* group, *A. muciniphila*, *Clostridium* spp. кластеров XIV, IV, *F. prausnitzii* и экспрессию генов *Foxp3*<sup>+</sup>, что свидетельствует о восстановлении гомеостаза кишечного микробиома. Полученные результаты показали, что *B. fragilis* может с успехом применяться при лечении воспалительных заболеваний кишечника или заболеваний с нарушением барьерной функции кишечника.

**Ключевые слова:** микробиом, кишечно-ассоциированная лимфоидная ткань, сальмонелла, ванкомицин, бактероиды, экспрессия, ПЦР-РВ.

## SALMONELLA-INDUCED CHANGES IN THE LEVEL OF KEY IMMUNOREGULATORY BACTERIA AFFECT THE TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY OF THE *Foxp3* AND *RORγt* GENES IN THE GUT-ASSOCIATED LYMPHOID TISSUE OF RATS

Bukina Yu.V.<sup>a</sup>, Fedoniuk L.Ya.<sup>b</sup>, Koval G.D.<sup>c</sup>, Shekhovtsova Iu.O.<sup>d</sup>, Kamyshnyi A.M.<sup>a</sup>, Gubar A.O.<sup>a</sup>, Gubka V.O.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine

<sup>b</sup> Ternopil State Medical University, Ternopil, Ukraine

<sup>c</sup> Bukovinian State Medical University, Chernovtsy, Ukraine

<sup>d</sup> Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

**Abstract.** Intestinal microbes involved in many physiological processes owner, contributes to the formation and maintenance of immune homeostasis by regulating immune responses to protect against colonization by pathogens. A special role in the differentiation of various subpopulations of T-lymphocytes play the segmental filamentous bacteria (*Segmented filamentous bacteria*, SFB), capable of inducing a gut-associated lymphoid tissue (GALT) differentiation proinflammatory Th17-cells and members of the genus *Clostridium* (cluster IV and XIVa) and *Bacteroides fragilis* (polysaccharide A [PSA]), stimulating the formation of regulatory T-cells (Treg) and production of suppressor of cytokine IL-10. Important metabolites of *B. fragilis* are short-chain fatty acids (SCFA), which are able to activate GALT cells through the *FFAR2* receptor. Lowering of the SCFA concentration leads to the reduction of the number of Treg in the intestine and breaks Th17/Treg balance. These changes lead to direct reducing of mRNA *FFAR2*, *Foxp3* expression and increasing in *RORγt* GALT. Therefore, the goal was to determine the level of the key in the edge immunoregulatory bacteria intestinal microflora rats and their effects on the transcriptional activity of the genes *Foxp3* and *RORγt* in GALT with Salmonella-induced inflammation and during administration of vancomycin and *B. fragilis*. To determine the genus and species of bacteria, as well as their number in the microflora of rats, was used the method of polymerase chain reaction (PCR-RV) with their identification by 16S rDNA genes. To study the transcriptional activity of genes using polymerase chain reaction reverse transcription real-time (RT-PCR). During the experiment with the introduction of animals vancomycin and Salmonella there was an increase in the level of SFB and a decrease in *A. muciniphila*, *F. prausnitzii*. Also, during infecting rats with *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* on the background of pre-treatment with vancomycin, there was an increase in the number of SFBs against the background of a pronounced decrease in *Bacteroides–Prevotella* group, *A. muciniphila*, *Clostridium* spp. clusters XIV, IV, and *F. prausnitzii*, which led to a decrease in the expression level of *Foxp3*<sup>+</sup> mRNA and an increase in *RORγt*<sup>+</sup>, respectively. However, administration of *B. fragilis* to animals receiving *S. Enteritidis* or *S. Typhimurium* against pretreatment with vancomycin caused a decrease in the level of SFB and mRNA *RORγt*<sup>+</sup>, and, conversely, increased the number of *Bacteroides–Prevotella* group, *A. muciniphila*, *Clostridium* spp. clusters XIV, IV, *F. prausnitzii* and expression of *Foxp3*<sup>+</sup> genes, which indicates the restoration of the homeostasis of the intestinal microbiome. The obtained results showed that *B. fragilis* can be successfully used in the treatment of inflammatory bowel diseases or diseases with impaired intestinal barrier function.

**Key words:** microbiome, gut-associated lymphoid tissue, Salmonella, Vancomycin, Bacteroides, expression, RT-PCR.

Многовековая коэволюция хозяина и микробов привели к их симбиозу, в котором микробиота участвует во многих физиологических процессах хозяина, а он, в свою очередь, предоставляет субстрат для питания бактерий [29].

В дополнение к метаболическим функциям, микробиота способствует формированию и поддержанию иммунного гомеостаза за счет регуляции иммунных реакций, направленных на защиту от колонизации патогенами [30].

Среди огромного количества комменсальных бактерий, населяющих ЖКТ, особую роль играют отдельные виды ключевых иммунорегуляторных бактерий, которые направляют дифференцировку различных субпопуляций Т-лимфоцитов, а Т-клеточные рецепторы (TCR) этих иммунных клеток являются комменсал-специфическими [19, 37]. В этом контексте сегментарные нитевидные бактерии (SFB) являются индукторами дифференцировки Т-хелперов 17 типа (Th17), а большинство SFB-индуцированных Th17-клеток, в свою очередь, являются специфичными для антигенов SFB. Используя гибридные TCR у SFB-колонизированных мышей, Yang и соавт. показали, что большинство TCR Th17-клеток специфически распознают антигены SFB [40].

Среди обитающих в кишечнике 19 кластеров (от I до XIX) класса *Clostridia* наибольшим Treg-индуцирующим потенциалом обладают представители кластеров IV и XIVa (также известные как группы *Clostridium leptum* и *Clostridium coccoides* соответственно). *Clostridium* кластера XIVa включает в себя виды, относящиеся к родам *Clostridium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Coprococcus*, *Dorea*, *Lachnospira*, *Roseburia* и *Butyrivibrio*. *Clostridium* кластера IV состоит из родов *Clostridium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus* и *Anaerofilum* [26]. В частности, Treg-индуцирующая активность у мышей была обнаружена в коктейле из 46 штаммов рода *Clostridium*, принадлежащих к кластерам IV и XIVa [6]. Был также идентифицирован коктейль из 17 человеческих штаммов *Clostridia*, обладающий активностью Treg-индуцирования [5]. Одним из представителей *Clostridium* кластера IV является вид *Faecalibacterium prausnitzii*, влияющий на баланс Th17/Treg в кишечно-ассоциированной лимфоидной ткани (КАЛТ) [42]. *F. prausnitzii* — один из основных производителей бутирата в кишечнике и способен уменьшать воспаление за счет стимуляции продукции большого количества IL-10 и блокады активации ядерного фактора NF-κB, что приводит к подавлению выработки провоспалительных цитокинов (IFNγ, TNFα, IL-1β, IL-8, IL-12) и повышению активности *Foxp3*<sup>+</sup> Tregs в КАЛТ [12]. В 2016 г. в супернатантах культур *F. prausnitzii* идентифицировали белок, названный микробной противовоспалительной молекулой (MAM) [32]. Было показано, что по крайней мере семь пептидов белка MAM *F. prausnitzii* индуцируют продукцию IL-10 *in vitro* и блокируют развитие DSS-индуцированного колита у мышей [8].

Индукторами дифференцировки Т-регуляторных клеток в кишечнике являются также представители филума *Bacteroidetes* *Bacteroides fragilis* и *Bacteroides thetaiotaomicron* [39]. Важными

метаболитами *B. fragilis* являются короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), выполняющие роль связующего звена между микробиотой и иммунной системой, которые активируют клетки КАЛТ через рецептор *FFAR2*. Уменьшение концентрации таких КЦЖК, как бутират, пропионат и ацетат, снижает численность Treg в кишечнике и нарушает баланс Th17/Treg, а уровень мРНК *FFAR2* изменяется при развитии экспериментальных ВЗК [36]. Ранее мы показали, что введение *B. fragilis* животным, предобработанным ванкомицином, с последующим инфицированием *S. Typhimurium* повышает уровень мРНК гена *FFAR2* в КАЛТ, влияет на экспрессию эффекторных белков сальмонелл SipA, SopB, SopE2 [1], а также обуславливает увеличение уровня концентрации КЦЖК, что способствует снижению сальмонелла-индуцированного воспаления [9].

Значительный интерес представляет и иммунорегуляторный потенциал *Akkermansia muciniphila* — муцин-деградирующей бактерии из филума *Verrucomicrobia*. Plovier и соавт. (2017) показали, что введение *A. muciniphila* либо ее наружного мембранного белка Amuc\_1100 активирует Toll-подобные рецепторы 2 типа (TLR2), сигнализация через которые увеличивала экспрессию генов, кодирующих белки плотных контактов claudin 3 и occludin [31].

Помимо иммунорегуляторного потенциала вышеуказанных комменсальных бактерий, значительный интерес представляет их способность повышать устойчивость к колонизации и инвазии возбудителей за счет конкурентного вытеснения за метаболиты, выработки ингибирующих веществ и развития иммунных реакций в КАЛТ. Поэтому целью работы было определить уровень ключевых иммунорегуляторных бактерий в пристеночной микробиоте кишечника крыс и его влияние на транскрипционную активность генов *Foxp3* и *RORγt* в КАЛТ при сальмонелла-индуцированном воспалении и на фоне введения ванкомицина и *B. fragilis*.

## Материалы и методы

Исследования проводились на 120 самцах крыс линии Вистар массой 110–150 г в возрасте 2–3 месяца. Животные были разделены на восемь групп по 15 крыс в каждой группе. Группа 1 — контрольные животные; группа 2 — Vancomycin (животные, которым вводили ванкомицин в дозе 50 мг/кг); группа 3 — *S. Enteritidis* (животные, которым вводили *S. Enteritidis* в количестве  $3 \times 10^8$  КОЕ/мл); группа 4 — *S. Typhimurium* (животные, которым вводили *S. Typhimurium* в количестве  $3 \times 10^8$  КОЕ/мл); группа 5 — Vancomycin+*S. Enteritidis* (животные, получившие при пероральном вве-

дении ванкомицин в дозе 50 мг/кг и через сутки получившие бактериальную нагрузку *S. Enteritidis* в количестве  $3 \times 10^8$  КОЕ/мл); группа 6 — Vancomycin+*S. Typhimurium* (животные, получившие при введении *per os* ванкомицин в дозе 50 мг/кг и через сутки получившие бактериальную нагрузку *S. Typhimurium* в количестве  $3 \times 10^8$  КОЕ/мл); группа 7 — Vancomycin+*S. Enteritidis*+*B. fragilis* (животные, получившие при пероральном введении ванкомицин в дозе 50 мг/кг, через сутки — бактериальную нагрузку *S. Enteritidis* в количестве  $3 \times 10^8$  КОЕ/мл и на следующий день *B. fragilis* в количестве  $3 \times 10^8$  КОЕ/мл); группа 8 — Vancomycin+*S. Typhimurium*+*B. fragilis* (животные, получившие при пероральном введении ванкомицин в дозе 50 мг/кг, через сутки — бактериальную нагрузку *S. Typhimurium* в количестве  $3 \times 10^8$  КОЕ/мл и на следующий день — *B. fragilis* в количестве  $3 \times 10^8$  КОЕ/мл). На пятые сутки крыс выводили из эксперимента с соблюдением принципов эвтаназии. Заражение животных проводили суточными культурами сальмонелл, выращенных на 1,5% МПА, полученных из музея штаммов микроорганизмов Украинского центра по контролю и мониторингу заболеваний МОЗ Украины. Культуры бактериоидов выращивали на питательных средах, приготовленных согласно методическим рекомендациям «Лабораторная диагностика гнойно-воспалительных заболеваний, обусловленных аспорогенными анаэробными микроорганизмами» (Харьков, 2000). Бактериальные суспензии стандартизировали при помощи денситометра DEN-1B (Biosan, Латвия) по МакФарланду (McF). Для введения крысам *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* и *B. fragilis* нами были приготовлены суспензии в концентрации 1,0 стандарта McF, что соответствует концентрации  $3 \times 10^8$  КОЕ/мл.

Молекулярно-генетические исследования по определению родовой и видовой принадлежности бактерий, а также их количественного содержания в микробиоте крыс проводились методом полимеразной цепной реакции (ПЦР-РВ) с идентификацией их по генам 16S rDNA. В качестве материала для ПЦР-РВ исследований микробиома использовали пристеночное содержимое кишечника крыс. Соскобы со слизистой оболочки подвздошной кишки лизировали в буфере ASL (Qiagen, Германия). Выделение тотальной ДНК из соскобов выполнялось в соответствии с инструкциями производителя. Обилие кишечных бактерий измеряли количественной ПЦР на термоциклере CFX-96 (Bio-Rad, США) с использованием SYBR Green Master Mix (Thermo Scientific, США) и специфических видо- и родоспецифических праймеров (Thermo Scientific, США) (см. табл. 1). Количественные результаты нормировали по универсальной 16S rDNA и анализировали с использованием метода  $\Delta Ct$ . Статистический анализ выполнялся с использованием GraphPad Prism (GraphPad Software).

Определение уровня транскрипционной активности генов *Foxp3*, *ROR $\gamma$ t* в КАЛТ проводилось с использованием полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ПЦР-ОТ). РНК выделяли из сгруппированных лимфоидных узелков (Пейеровых бляшек) подвздошной кишки крыс. Выделение тотальной РНК проводили с использованием набора «Trizol RNA Prep 100» (Лаборатория Изоген, Россия), который содержит Trizol reagent и ExtraGene. Для проведения обратной транскрипции и получения кДНК использовали «Набор реагентов для проведения обратной транскрипции (ОТ-1)» (Синтол, Россия). Реакционная смесь общим объемом 25 мкл содержала: 2 мкл тотальной РНК, 1 мкл

**Таблица 1. Праймеры для определения бактериальных групп по 16S rDNA**

Table 1. Primers for the determination of bacterial groups of 16S rDNA

16S universal	UniF340: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3'
16S universal	UniR514: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGGC-3'
Segmented filamentous bacteria (SFB)	SFB736F: 5'-GACGCTAGGCATGAGAGCAT-3'
Segmented filamentous bacteria (SFB)	SFB844R: 5'-GACGGCACGGATTGTTATTCA-3'
<i>Akkermansia muciniphila</i>	F: 5'-CAGCACGTGAAGGTGGGGAC-3'
<i>Akkermansia muciniphila</i>	R: 5'-CCTTGCGGTTGGCTTCAGAT-3'
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	F: 5'-CCCTTCAGTGCCGCAGT-3'
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	R: 5'-GTCGCAGGATGTCAAGAC-3'
<i>Bacteroides-Prevotella</i> group	Bac303FGAAGGTCCCCACATTG
<i>Bacteroides-Prevotella</i> group	Bac708RCAATCGGAGTTCTTCGTG
<i>Clostridial</i> cluster IV	F: TTAACACAATAAGTAATCCACCTGG
<i>Clostridial</i> cluster IV	R: ACCTTCCTCCGTTTTGTCAAC
<i>Clostridial</i> cluster XIV	F: CGGTACCTGACTAAGAAGC
<i>Clostridial</i> cluster XIV	R: AGTTTCATTCTTGCGAACG

Random-6 праймера, 8,5 мкл деионизированной  $H_2O$ , очищенной от нуклеаз, 12,5 мкл реакционной смеси и 1 мкл ревертазы MMLV-RT. Обратную транскрипцию проводили при  $45^\circ C$  на протяжении 45 мин с последующим нагреванием для инактивирования MMLV-RT на протяжении 5 мин при  $92^\circ C$ .

Для определения уровня экспрессии исследуемых генов крыс *Foxp3*, *ROR $\gamma$ t* использовали набор реактивов Maxima SYBR Green qPCR MasterMix (2x) (Thermo Scientific, США) и амплификатор CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad, США). Финальная реакционная смесь для амплификации содержала краситель SYBR Green, ДНК-полимеразу Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase, по 0,2 мкл прямого и обратного специфических праймеров, 1 мкл матрицы (кДНК). Реакционную смесь доводили до общего объема 25 мкл добавлением деионизированной  $H_2O$ . Специфические пары праймеров (5'–3') для анализа исследуемых и референсного генов были подобраны при помощи программного обеспечения Primer-Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast)) и изготовлены фирмами Metabion (Германия) и Thermo Scientific (США) (см. табл. 2).

После начальной денатурации на протяжении 10 мин при  $95^\circ C$  амплификация состояла из 45 циклов и проводилась при следующих условиях: денатурация —  $95^\circ C$ , 15 с; отжиг —  $59–61^\circ C$ , 30–60 с; элонгация —  $72^\circ C$ , 30 с. В качестве референс-гена для определения относительного значения изменения уровня экспрессии исследуемых генов крыс был использован ген глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH). Относительное нормализованное количество кДНК целевых генов определяли сравнительным методом  $\Delta\Delta Ct$ . Статистический анализ данных ПЦР проводили при помощи программного обеспечения CFX Manager™ (Bio-Rad, США). В эксперимент включали отрицательные контроли без добавления кДНК матрицы в реакцию ПЦР, без добавления мРНК матрицы в синтезе кДНК, без добавления фрагмента в синтезе кДНК. Все реакции амплификации выполняли на индивидуальных образцах в трех повторах.

## Результаты и обсуждение

В ходе проведения исследований полученные нами результаты показали, что при введении экспериментальным животным ванкомицина наблюдалось снижение численности представителей *F. prausnitzii* ( $p \leq 0,0017$ ) (рис. 1Б), *A. muciniphila* ( $p \leq 0,0001$ ) (рис. 1Б), представительство бактерий рода *Clostridium* cluster IV ( $p \leq 0,0046$ ) (рис. 1Д) и *Bacteroides+Prevotella*

**Таблица 2. Праймеры для определения уровня экспрессии генов *Foxp3* и *ROR $\gamma$ t* крысы**

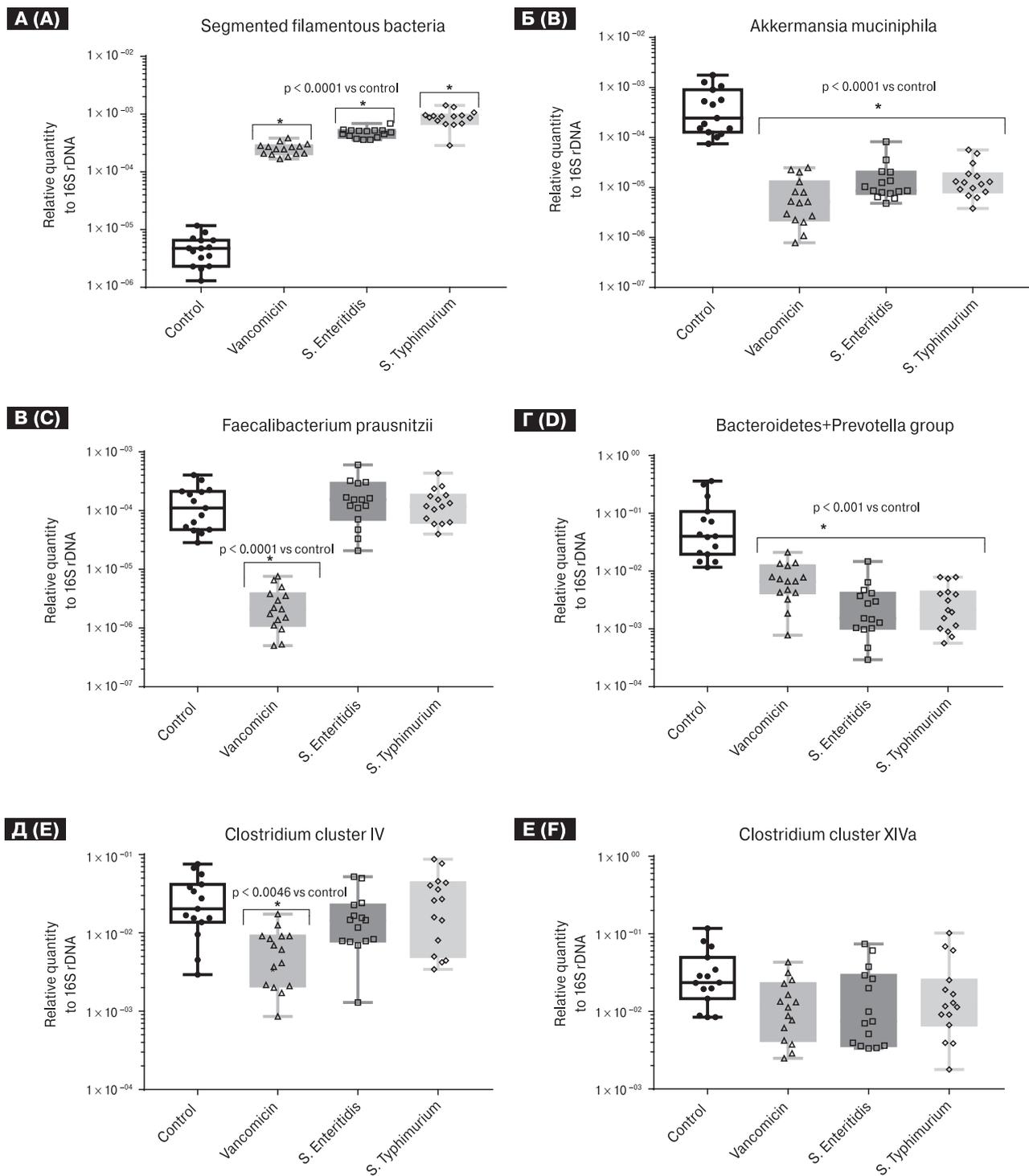
Table 2. Primers for determining the level of gene expression of *Foxp3* and *ROR $\gamma$ t* rats

Ген	Праймер
<i>Foxp3</i>	F = CGAGACTTGAAGTCAGCCAC R = TCTGAGGCAGGCTGGATAACG
<i>ROR<math>\gamma</math>t</i>	F = AACATCTCGGGAGTTGCTGG R = TCGATTTGTGAGGTGTGGGT
GAPDH	F = GCCTGGAGAAACCTGCCAAG R = GCCTGCTTACCACCTTCT

( $p \leq 0,0005$ ) (рис. 1Г) снижалось менее интенсивно, а уровень *Segmented filamentous bacteria* в этой группе достоверно увеличивался ( $p \leq 0,0001$ ) по сравнению с контролем (рис. 1А). Также при инфицировании крыс *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* в группах III и IV отмечалось уменьшение *A. muciniphila* ( $p \leq 0,0001$ ;  $p \leq 0,0001$ ) (рис. 1Б) и *Bacteroides+Prevotella* ( $p \leq 0,0002$ ;  $p \leq 0,0002$ ) (рис. 1Г), а количество представителей SFB ( $p \leq 0,0001$ ) (рис. 1А) возрастало по отношению к контрольной группе.

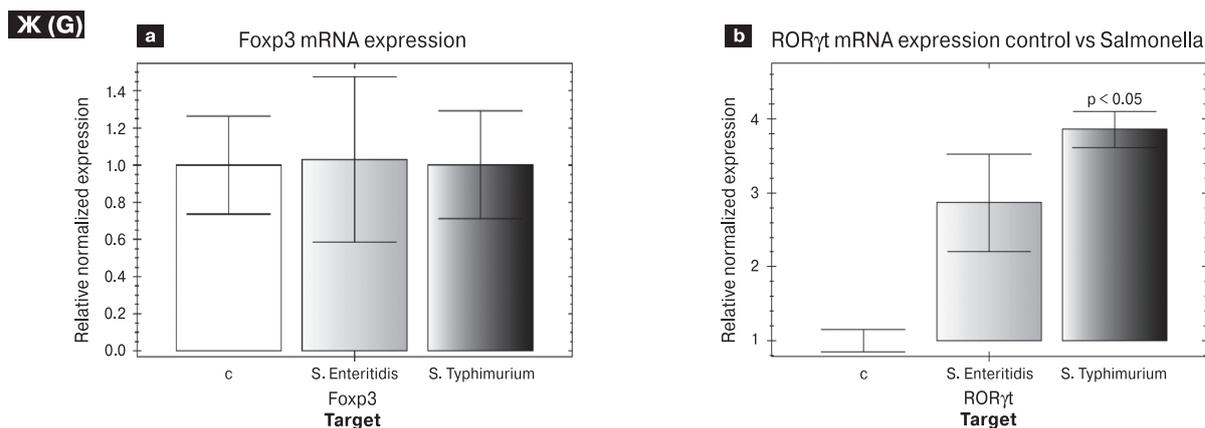
В другом случае, при комбинированном введении ванкомицина и сальмонелл, в пристеночной микробиоте крыс наблюдались более выраженные изменения количественного состава представителей этих родов бактерий. Так, в V и VI экспериментальных группах регистрировалось резкое снижение численности *F. prausnitzii* ( $p \leq 0,0011$ ;  $p \leq 0,0002$ ) (рис. 2В, 3В), *A. muciniphila* ( $p \leq 0,0286$ ;  $p \leq 0,0055$ ) (рис. 2Б, 3Б), *Clostridium* cluster IV ( $p \leq 0,0024$ ;  $p \leq 0,0033$ ) (рис. 2Д, 3Д), *Clostridium* cluster XIV ( $p \leq 0,0127$ ;  $p \leq 0,0198$ ) (рис. 2Е, 3Е) и *Bacteroides+Prevotella* ( $p \leq 0,0189$ ;  $p \leq 0,0017$ ) (рис. 2Г, 3Г), а уровень SFB достоверно увеличивался ( $p \leq 0,0001$ ;  $p \leq 0,0001$ ) (рис. 2А, 3А) по сравнению с третьей и четвертой группами. Однако при совместном введении ванкомицина, сальмонелл и *B. fragilis* в VII и VIII группах отмечалось интенсивное увеличение количества *Clostridium* cluster IV ( $p \leq 0,0019$ ;  $p \leq 0,0005$ ) (рис. 2Д, 3Д), *Clostridium* cluster XIV ( $p \leq 0,0151$ ;  $p \leq 0,0021$ ) (рис. 2Е, 3Е) и *Bacteroides+Prevotella* ( $p \leq 0,0001$ ;  $p \leq 0,0001$ ) (рис. 2Г, 3Г). Численность представителей *F. prausnitzii* и *A. muciniphila* достоверно возрастала только в VIII группе ( $p \leq 0,0166$ ;  $p \leq 0,0001$ ) (рис. 3Б, 3В), а уровень SFB в этих группах достоверно снижался ( $p \leq 0,0001$ ;  $p \leq 0,0001$ ) (рис. 2А, 3А) по сравнению с контролем (см. табл. 3).

Учитывая, что *B. fragilis* являются одними из основных продуцентов КЦЖК, которые активируют клетки КАЛТ, мы определили уровень экспрессии мРНК транскрипционного фактора *Foxp3*, направляющего дифференцировку Т-клеток в сторону Treg. Так, транскрипционная активность гена *Foxp3* в группах



**Рисунок 1 (1-й фрагмент). Относительное количество представителей *Segmented filamentous bacteria* (А), *Akkermansia muciniphila* (Б), *Faecalibacterium prausnitzii* (В), *Bacteroides+Prevotella* (Г), *Clostridium* cluster IV (Д) и *Clostridium* cluster XIV (Е) по 16S rDNA при введении ванкомицина, *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium***

Figure 1 (fragment 1). The relative number of representatives of *Segmented filamentous bacteria* (A), *Akkermansia muciniphila* (B), *Faecalibacterium prausnitzii* (C), *Bacteroides+Prevotella* (D), *Clostridium* cluster IV (E) и *Clostridium* cluster XIV (F) by 16S rDNA with the introduction of vancomycin, *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*



**Рисунок 1 (2-й фрагмент). Относительное нормализованное количество мРНК генов *Foxp3* (a) и *RORγt* (b) в сгруппированных лимфоидных узелках подвздошной кишки крыс при ведении *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium***

Figure 1 (fragment 2). Relative normalized amount mRNA of *Foxp3* (a) and *RORγt* (b) genes in grouped lymphoid nodules of the ileum of rats when administered by *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*

III, IV и VI оставалась без изменений [рис. 1Ж(a), 2Ж (c1)] и достоверно снижалась в V группе (на 67%,  $p \leq 0,05$ ) [рис. 2Ж (c)]. Однако при введении *B. fragilis* относительное нормализованное количество мРНК гена *Foxp3* в группах Vancomycin+S. Enteritidis+B. fragilis и Vancomycin+S. Typhimurium+B. fragilis увеличилось в 2,5 и 85 раз соответственно ( $p \leq 0,05$ ) [рис. 3Ж (e, e1)]. Увеличение уровня экспрессии транскрипционного фактора *RORγt*, регулирующего дифференцировку субпопуляции Th17-клеток, наблюдалось в III, IV, V и VI группах [рис. 1Ж (b), 2Ж (d, d1)] в 2,9; 3,9; 13 и 2,5 раза и достоверно снижался в VIII группе (на 70%,  $p \leq 0,05$ ) (рис. 3Ж (f1), рис. 4, III обложка).

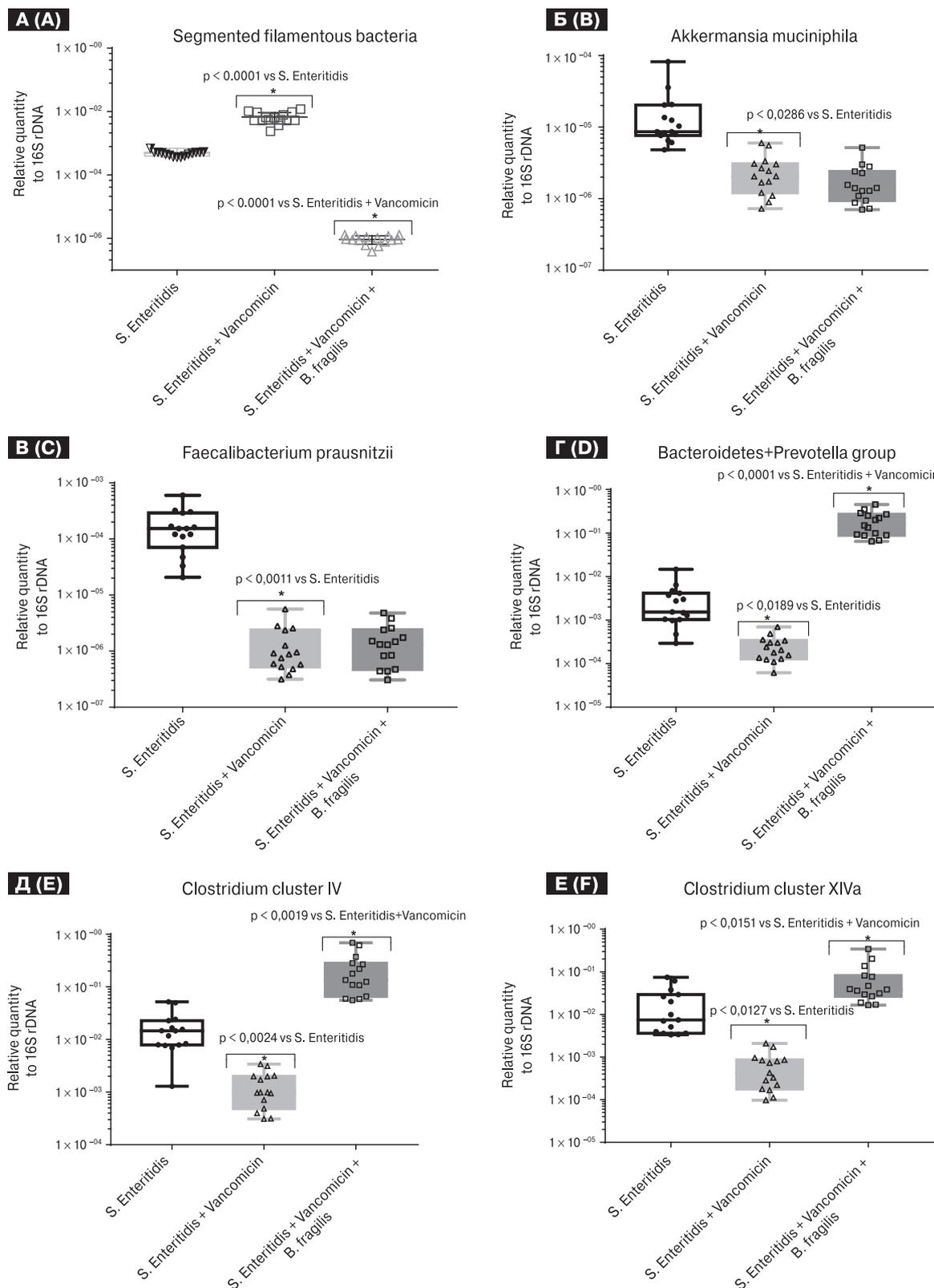
## Обсуждение

Определенные представители кишечной микрофлоры, такие как *Segmented filamentous bacteria*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Akkermansia muciniphila*, *Clostridium* cluster IV, *Clostridium* cluster XIVa, *Bacteroides fragilis*, способны влиять на активацию врожденных и адаптивных звеньев в КАЛТ, что определяет исход инфекционного заболевания [10, 22].

Существует сложная и динамическая перекрестная связь между кишечной микробиотой и дифференцировкой CD4<sup>+</sup> T-клеток, играющих важную роль в организации адаптивных иммунных реакций в условиях гомеостаза и воспаления. Увеличение продукции Th17-клеток в тонком кишечнике может быть вызвано колонизацией SFB, измененной флорой Шаздлера (ASF) и зачастую зависит от количественного содержания кластридий и определенных комменсалов. Почему SFB преимущественно индуцирует дифференцировку Th17?

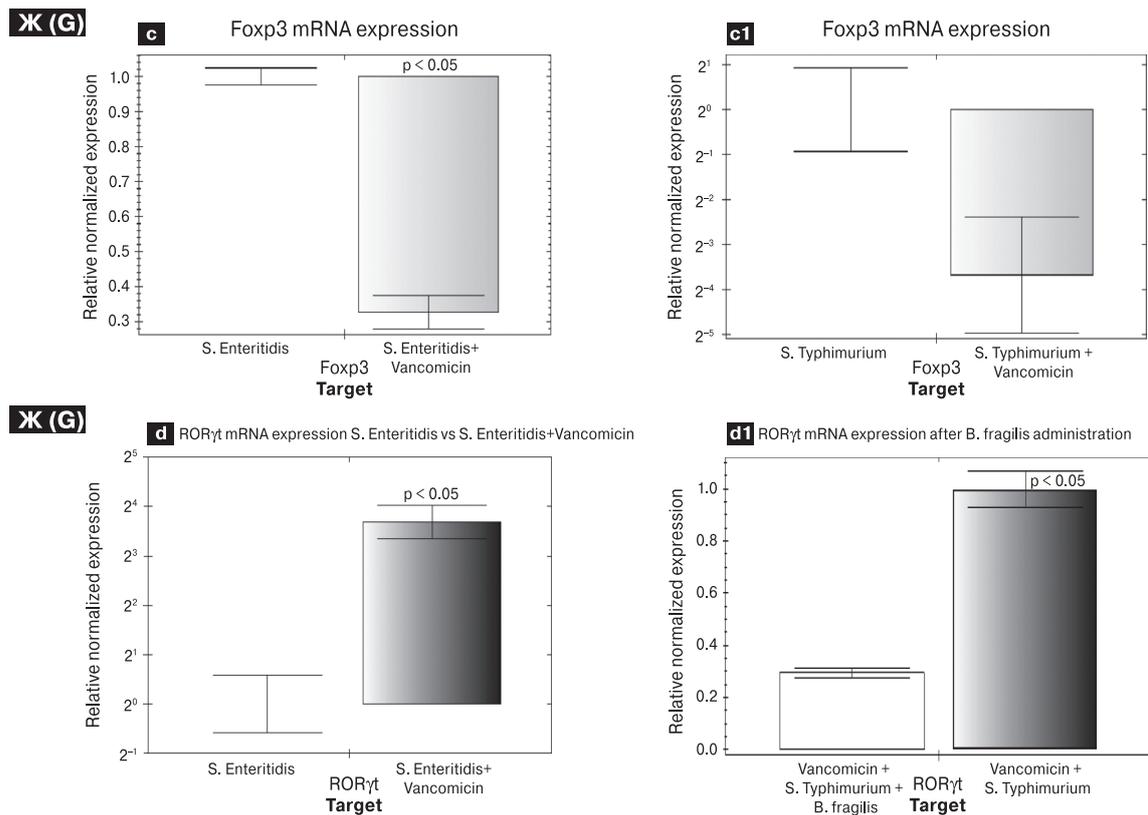
Два недавних исследования показали, что ключевой особенностью SFB, необходимой для индукции Th17, является тесная связь с эпителиальными клетками кишечника. Используя специфичные для мышей и крыс штаммы SFB, Atarashi и соавт. обнаружили, что только штаммы, полученные от первоначального хозяина, способны индуцировать клетки Th17, что было связано с видоспецифической адгезией. Адгезия SFB индуцировала экспрессию эпителиальных сывороточных амилоидных белков (SAA1/2) и реактивного белка, продуцирующего кислород — Duox2 — в эпителиальных клетках. SAA1 усиливает индукцию IL-17A и IL-17F клетками Th17, а также воздействует на дендритные клетки, способствуя индукции Th17 и повышению экспрессии *RORγt*<sup>+</sup> [4]. Также действие IL-22, канонического цитокина Th17, индуцирует выработку антимикробных пептидов, эффективных против бактерий, способных вызвать присоединение или удаление штаммов, таких как *C. rodentium* и некоторых штаммов *E. coli*, *S. Typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* [20, 34]. Обнаружено, что колонизация SFB приводит к повышенной экспрессии молекул МНС II класса на эпителиальных клетках кишечника и влияет на гликозилирование энтероцитов, специфически вызывая экспрессию GM1-гликолипидов, предназначенных для ингибирования прикрепления другого агента [41].

Полученные нами результаты совпадают с данными других экспериментов, демонстрирующих, что колонизация кишечника *Bacteroides fragilis* с помощью его полисахарида А (PSA) индуцирует Tregs и продукцию IL-10 посредством передачи сигналов через TLR2 [17]. Кроме того, бактериальные метаболиты — короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК) —



**Рисунок 2 (1-й фрагмент). Относительное число представителей *Segmented filamentous bacteria* (А), *Akkermansia muciniphila* (Б), *Faecalibacterium prausnitzii* (В), *Bacteroides+Prevotella* (Г), *Clostridium* cluster IV (Д) и *Clostridium* cluster XIV (Е) по 16S rDNA при комбинированном ведении ванкомицина, *S. Enteritidis* и *B. fragilis***

Figure 2 (fragment 1). The relative number of representatives of *Segmented filamentous bacteria* (A), *Akkermansia muciniphila* (B), *Faecalibacterium prausnitzii* (C), *Bacteroides+Prevotella* (D), *Clostridium* cluster IV (E) и *Clostridium* cluster XIV (F) by 16S rDNA with the combined management of vancomycin, *S. Enteritidis* и *B. fragilis*



**Рисунок 2 (2-й фрагмент). Относительное нормализованное количество мРНК генов *Foxp3* (c, c1) и *ROR $\gamma t$*  (d, d1) в сгруппированных лимфоидных узелках подвздошной кишки крыс при ведении *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* на фоне предобработки ванкомицином. Нормализация по методу  $\Delta\Delta Ct$  с референс-геном *GAPDH***

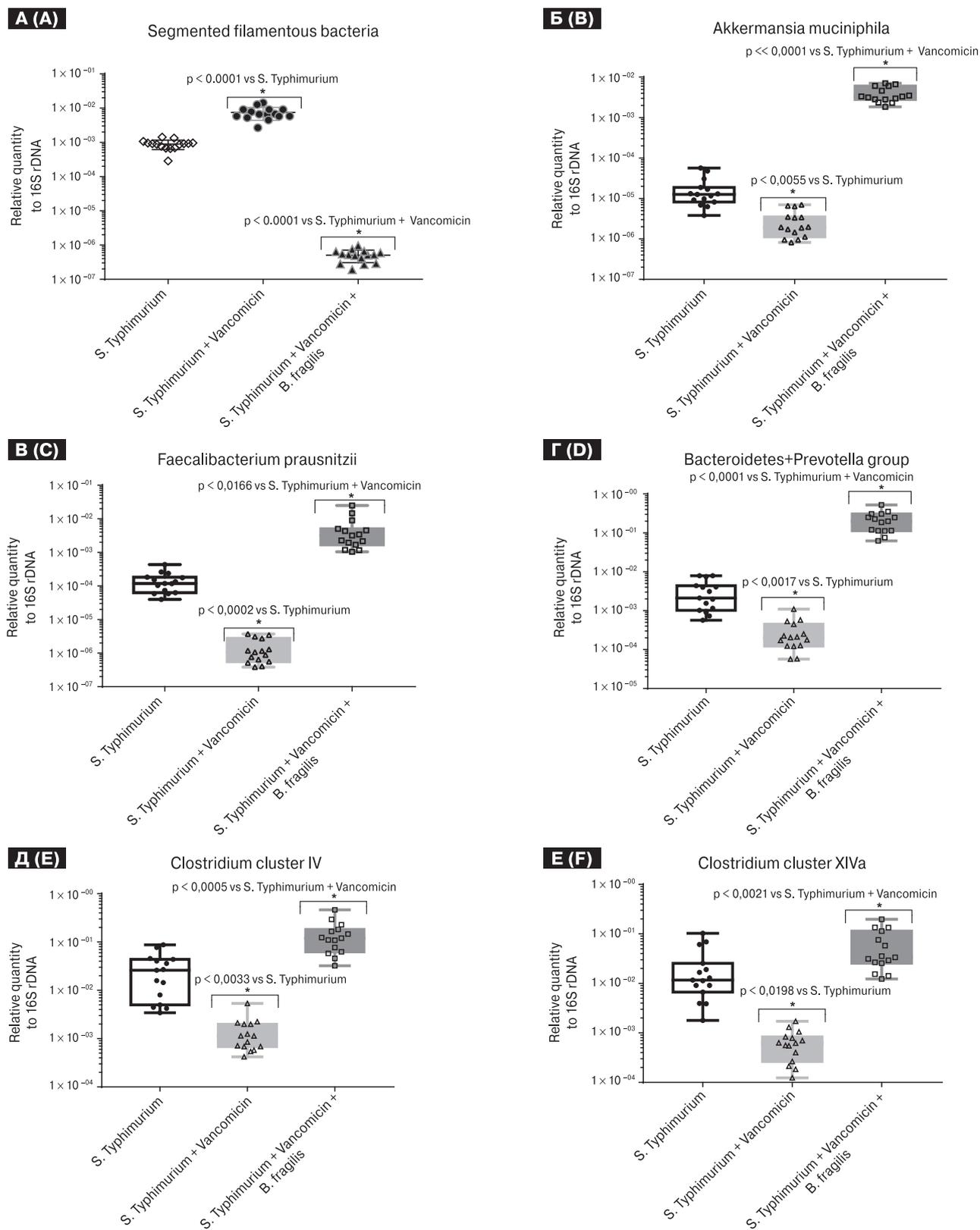
Figure 2 (fragment 2). Relative normalized amount of mRNA *Foxp3* (c, c1) and *ROR $\gamma t$*  (d, d1) genes in grouped lymphoid nodules of the ileum of rats when administered by *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* on the background of pre-treatment with vancomycin. Normalization by the  $\Delta\Delta Ct$  method with the *GAPDH* reference gene

также способны регулировать продукцию Tregs клеток и усиливать ацетилирование локуса *Foxp3* в Tregs [33]. При исследовании мышей, колонизированных 17 человеческими штаммами *Clostridium*, уровни содержания КЦЖК (ацетата, пропионата, изобутирата и бутирата) были повышены, что стимулировало продукцию супрессорного цитокина TGF $\beta$  в эпителиальных клетках толстой кишки и косвенно способствовало развитию Tregs. Рецепторы, которые активируются SCFA, а именно связанные с G-белком (GPCR), такие как GPR43 (*FFAR2*), экспрессируются как в эпителиальных клетках, так и в большинстве гематопозитических клетках. Соответственно, мыши, лишённые GPR43, имели меньшее количество Tregs [3].

Использование очищенного PSA может защитить животных от развития колита и рассеянного склероза. Известно, что *B. fragilis* тесно связывается с криптами кишечника. Когда у *B. fragilis* разрушается PSA, они теряют способность индуцировать Tregs и ассоциировать с кишечным эпителием, что позволяет предположить важность Tregs для колонизации *B. fragilis* в этой

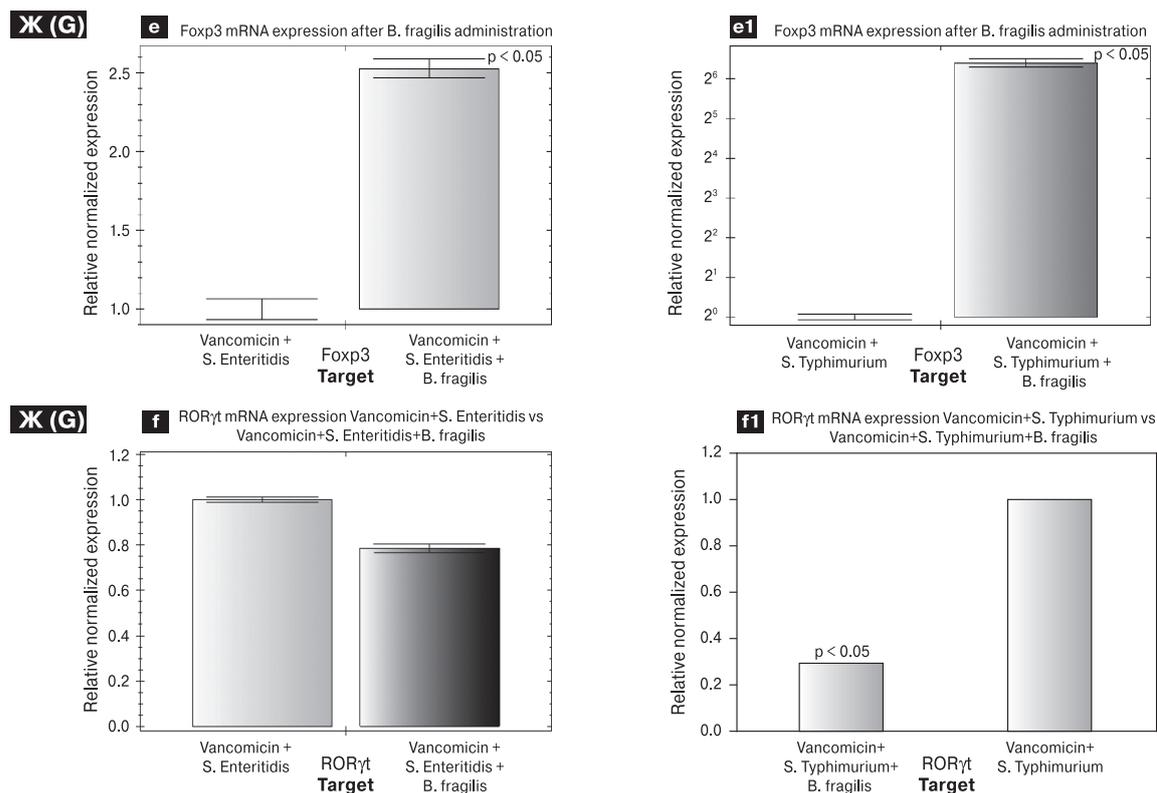
нише. Эффект PSA является примером мощного терапевтического потенциала, который может быть раскрыт посредством детального изучения комменсальных микроорганизмов [14].

В целом комменсалы могут регулировать иммунную специфичность посредством нескольких механизмов: а) микроорганизмы в кишечнике могут индуцировать популяции Т-клеток, которые экспрессируют два TCR: один TCR распознает сам комменсал, а другой реагирует на собственный пептид. Миграция этих Т-клеток в ткани хозяина может вызвать патологию и аутоиммунитет; б) CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки могут быть активированы независимо от их TCR через Toll-подобные рецепторы (TLR). В частности, стимуляция бактериоидами TLR на Т-клетках способствует их дифференцировке в Treg; в) комменсальные микроорганизмы могут экспрессировать эпитопы, имитирующие собственные пептиды, которые, как известно, управляют аутоиммунитетом. Собственные реактивные Т-клетки будут активироваться этими антигенами в кишечнике, а затем поступать в ткани и вызывать аутоиммунитет [28].



**Рисунок 3 (1-й фрагмент). Относительное число представителей *Segmented filamentous bacteria* (А), *Akkermansia muciniphila* (Б), *Faecalibacterium prausnitzii* (В), *Bacteroides+Prevotella* (Г), *Clostridium cluster IV* (Д) и *Clostridium cluster XIV* (Е) по 16S rDNA при сочетанном ведении ванкомицина, *S. Typhimurium* и *B. fragilis***

Figure 3 (fragment 1). The relative number of representatives of *Segmented filamentous bacteria* (A), *Akkermansia muciniphila* (B), *Faecalibacterium prausnitzii* (C), *Bacteroides+Prevotella* (D), *Clostridium cluster IV* (E) и *Clostridium cluster XIV* (F) by 16S rDNA with combined management of vancomycin, *S. Typhimurium* and *B. fragilis*



**Рисунок 3 (2-й фрагмент). Относительное нормализованное количество мРНК генов *Foxp3* (e, e1) и *RORγt* (f, f1) в сгруппированных лимфоидных узелках подвздошной кишки крыс при ведении *B. fragilis* экспериментальным животным получавшим *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* на фоне предобработки ванкомицином. Нормализация по методу  $\Delta\Delta Ct$  с референс-геном *GAPDH***

Figure 3 (fragment 2). Relative normalized amount of mRNA *Foxp3* (e, e1) and *RORγt* (f, f1) genes in grouped lymphoid nodules of the ileum of rats when *B. fragilis* was administered to experimental animals treated with *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* on the background of pre-treatment with vancomycin. Normalization by the  $\Delta\Delta Ct$  method with the *GAPDH* reference gene

Комменсальная микробиота кишечника обеспечивает устойчивость к колонизации патогенными микроорганизмами. Эксперименты показали, что у мышей при заражении *S. Typhimurium* определяется более высокая устойчивость к патогенам, нежели в условиях их предобработки антибиотиком, при которой наблюдается более резкое нарушение резидентного сообщества, что приводит к повышенной инвазии сальмонелл и формированию у людей хронического бессимптомного носительства. Комменсальные виды *Bacteroides* spp. способны ограничивать сальмонелла-индуцированную инфекцию в кишечнике за счет производства КЦЖК, таких как пропионат, ацетат и бутират. Однако сальмонеллы могут избегать реакций врожденного и адаптивного иммунитета посредством продукции эффекторных белков, вызывающих внедрение, выживание и ауторепродукцию бактерий в пределах тканей организма, что приводит к воспалению кишечника [2, 7, 29].

Было обнаружено, что введение живых *A. muciniphila* повышало эндогенную выработ-

ку специфических биологически активных липидов, оказывало противовоспалительное действие и регулировало эндогенную выработку кишечных пептидов, участвующих в регуляции глюкозы и барьерной функции кишечника, а именно глюкагоно-подобных пептидов 1 и 2 (GLP-1 и GLP-2) [11, 21, 24, 35]. Установлено, что высокий уровень метаболитов таких представителей, как *Clostridia*, может способствовать развитию Пейеровых бляшек,  $\alpha\beta$ -TCR интраэпителиальных лимфоцитов (IEL) и продукции IL-7, IL-6, TGF $\beta$ , IgA, а также влиять на соотношение CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> лимфоцитов [32]. Вдобавок *Clostridium* spp. XIV и IV кластеров, посредством активации экспрессии транскрипционного фактора *Foxp3* и IL-10, индуцируют накопление Tregs-клеток в собственной пластинке слизистой оболочки кишечника, а за счет матричных металлопротеиназ (MMP) активируют TGF- $\beta$  и индоламин 2,3-диоксигеназу (IDO) в эпителиальных клетках толстой кишки и снижают численность Th17, что игра-

**Таблица 3. Количественное определение содержания микроорганизмов в пристеночной микрофлоре крыс по 16S rDNA**  
 Table 3. Quantitative determination of the content of microorganisms in the wall microflora of rats by 16S rDNA

Группы	Segmented filamentous bacteria Candidatus <i>Arthromitus</i> subphylum <i>Clostridium</i>			<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> phylum <i>Firmicutes</i>			<i>Akkermansia muciniphila</i> phylum <i>Verrucomicrobia</i>		
	16S (CT mean)	SFB (CT mean)	2 <sup>-ΔCT</sup>	16S (CT mean)	<i>F. prausnitzii</i> (CT mean)	2 <sup>-ΔCT</sup>	16S (CT mean)	<i>A. muciniphila</i> (CT mean)	2 <sup>-ΔCT</sup>
Control	10,06	27,91	0,000005	9,74	22,93	0,00015	10,17	21,79	0,00051
Vancomycin	10,03	22,02	0,00025*	10,09	28,98	0,000028*	10,17	27,76	0,000083*
<i>S. Enteritidis</i>	9,94	21,0	0,00047*	10,32	23,25	0,00018	10,22	26,57	0,00017*
<i>S. Typhimurium</i>	9,92	20,13	0,00089*	9,96	22,98	0,00015	10,05	26,24	0,00018*
<i>S. Enteritidis</i> +Vancomycin	10,12	17,45	0,0067 <sup>a</sup>	10,28	30,24	0,0000014 <sup>a</sup>	9,95	28,81	0,0000025 <sup>a</sup>
<i>S. Typhimurium</i> +Vancomycin	9,91	17,09	0,0075 <sup>b</sup>	10,24	30,04	0,0000015 <sup>b</sup>	10,20	28,97	0,0000029 <sup>b</sup>
<i>S. Enteritidis</i> +Vancomycin+ <i>B. fragilis</i>	10,01	30,12	0,00000093 <sup>c</sup>	10,05	18,26	0,0068	9,73	17,99	0,0046
<i>S. Typhimurium</i> +Vancomycin+ <i>B. fragilis</i>	10,02	31,05	0,00000051 <sup>d</sup>	9,98	18,20	0,0054 <sup>d</sup>	9,90	18,01	0,0039 <sup>d</sup>
Группы	<i>Clostridium</i> cluster IV ( <i>Clostridium leptum</i> , <i>C. sporosphaeroides</i> , <i>C. cellulosi</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Ruminococcus</i> and <i>Anaerofilum</i> genera)			<i>Clostridium</i> cluster XIV ( <i>Clostridium. coccoides</i> , <i>C. aminovalericum</i> , <i>C. populeti</i> , <i>C. clostridiiforme</i> , <i>C. propionicum</i> , <i>C. neopropionicum</i> , <i>C. lentocellum</i> , <i>C. colinum</i> , <i>C. piliforme</i> , <i>Epulopiscium</i> sp., <i>Eubacterium rectale</i> , <i>E. cellulolyticum</i> , <i>Ruminococcus torques</i> , <i>R. gnavus</i> , <i>Dorea</i> , <i>Lachnospira</i> , <i>Butyrivibrio</i> genera, <i>Acetitomaculum ruminis</i> , <i>Epulopiscium</i> sp., <i>Coprococcus eutactus</i> , <i>Roseburia cecicola</i> , and <i>Streptococcus hansenii</i> )			<i>Bacteroides</i> + <i>Prevotella</i> <i>Bacterioidetes: Prevotella</i> cluster ( <i>P. melaninogenica</i> , <i>P. intermedia</i> , <i>P. nigrescens</i> , <i>P. ruminicola</i> , <i>P. zoogloeiformans</i> , <i>P. heparinolytica</i> ); <i>B. fragilis</i> ; <i>porphyromonas</i> cluster ( <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>P. endodontalis</i> , <i>P. asaccharolytica</i> , <i>P. circumdentaria</i> , <i>P. salivosa</i> )		
Control	9,96	15,54	0,029	10,02	15,28	0,045	9,83	14,17	0,091
Vancomycin	10,07	17,81	0,0064*	10,10	16,72	0,014	9,71	17,11	0,0077*
<i>S. Enteritidis</i>	10,13	16,44	0,017	9,82	16,33	0,021	9,94	18,93	0,0032*
<i>S. Typhimurium</i>	10,25	16,03	0,029	9,89	16,10	0,024	10,41	19,17	0,0032*
<i>S. Enteritidis</i> +Vancomycin	10,07	19,99	0,0014 <sup>a</sup>	9,88	21,04	0,00065 <sup>a</sup>	10,07	22,27	0,00026 <sup>a</sup>
<i>S. Typhimurium</i> +Vancomycin	10,27	20,07	0,0014 <sup>b</sup>	10,10	20,99	0,00066 <sup>b</sup>	9,96	22,18	0,00029 <sup>b</sup>
<i>S. Enteritidis</i> +Vancomycin+ <i>B. fragilis</i>	10,01	12,65	0,22 <sup>c</sup>	9,53	13,89	0,076 <sup>c</sup>	9,88	12,56	0,187 <sup>c</sup>
<i>S. Typhimurium</i> +Vancomycin+ <i>B. fragilis</i>	9,65	12,75	0,15 <sup>d</sup>	9,33	13,86	0,062 <sup>d</sup>	10,17	12,64	0,212 <sup>d</sup>

**Примечания.** \* Достоверность различий параметров  $p < 0,005$  по отношению к контрольной группе; а — достоверность различий параметров  $p < 0,005$  по отношению к группе *S. Enteritidis*; b — достоверность различий параметров  $p < 0,005$  по отношению к группе *S. Typhimurium*; с — достоверность различий параметров  $p < 0,005$  по отношению к группе *S. Enteritidis* + Vancomycin; d — достоверность различий параметров  $p < 0,005$  по отношению к группе *S. Typhimurium* + Vancomycin.

Notes. \* The reliability of the differences in the parameters  $p < 0,005$  in relation to the control group; a — the reliability of the differences in the parameters  $p < 0,005$  in relation to the group *S. Enteritidis*; b — the reliability of the differences between the parameters  $p < 0,005$  in relation to the group *S. Typhimurium*; c — the reliability of the differences between the parameters  $p < 0,005$  in relation to the group *S. Enteritidis* + Vancomycin; d — the reliability of the differences in the parameters  $p < 0,005$  in relation to the group *S. Typhimurium* + Vancomycin.

ет важную роль в поддержании врожденного и адаптивного иммунного гомеостаза в кишечнике [13, 15, 18, 23, 25, 27].

В целом до настоящего времени было известно, что только некоторые из комменсальных микробов способны модулировать специфические иммунные параметры, но последние работы показывают иммуномодулирующее действие филогенетически все более разнообразных кишечных микробов человека. Большинство бактерий оказывали несколько специализированных, дополнительных или избыточных транскрипционных и иммуномодулирующих эффектов. Удивительно, но зачастую они не зависели от микробной филогении. Эти исследования могут определить важные терапевтические эффекты.

Действительно, скрининг кишечного микробиома дал ряд открытий, как ожидаемых, так и непредвиденных. Например, было обнаружено, что отдельные микроорганизмы способны индуцировать клетки Th17 в эпителии кишечника до уровня, аналогичного уровню, вызываемому SFB, как это было подробно показано в других экспериментах [16]. Однако стало неожиданным наблюдение, что около четверти исследованных бактерий, охватывающих различные виды, могут вызывать индукцию *ROR $\gamma$ t+Helios-Tregs* в толстом кишечнике [38]. Другая, ранее не известная, но потенциально интересная иммуномодулирующая активность представителей *Veillonella* состоит в том, что они стимулируют увеличение IL-10-продуцирующих CD4<sup>+</sup> Т-клеток и параллельное снижение IL-22-продуцирующих эпителиальных клеток в толстой кишке. *L. rhamnosus*, значительно снижает число дендритных клеток, а *F. varium* оказывает необычайно сильную иммуностимулирующую активность [5].

## Выводы

Введение животным ванкомицина и сальмонелл обуславливало количественное изменение уровня ключевых иммунорегуляторных бактерий: увеличение уровня SFB и существенное уменьшение *A. muciniphila*, *F. prausnitzii*. При инфицировании крыс *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* на фоне предобработки ванкомицином наблюдалось более резкое изменение в количественном составе микробиоты, приводящее к уменьшению уровня экспрессии мРНК генов *Foxp3*<sup>+</sup> и увеличению *ROR $\gamma$ t*<sup>+</sup> соответственно. Однако введение экспериментальным животным *B. fragilis*, получавшим *S. Enteritidis* или *S. Typhimurium* на фоне предобработки ванкомицином, уменьшало уровни SFB и мРНК *ROR $\gamma$ t*<sup>+</sup>, а также значительно увеличивало представительство *Bacteroides–Prevotella* group, *A. muciniphila*, *Clostridium* spp. кластеров XIV, IV, *F. prausnitzii* и экспрессии генов *Foxp3*<sup>+</sup>, что свидетельствует о восстановлении гомеостаза кишечного микробиома.

Изучение молекулярных механизмов взаимодействия SFB с КАЛТ позволяет выяснить их влияние на физиологические, метаболические и иммунные процессы в кишечнике и, возможно, использовать *A. muciniphila*, *Clostridium* spp. кластеров XIV и IV, *F. prausnitzii* и *Bacteroides–Prevotella* group в качестве инструмента для разработки новых методов профилактики и терапии воспалительных заболеваний кишечника или заболеваний с нарушением барьерной функции кишечника.

*B. fragilis* снижает дисбиотические проявления, способствует восстановлению кишечного микробиома и может применяться как общая адьювантная терапия в сочетании с антибактериальными препаратами.

## Список литературы/References

1. Букина Ю.В., Камышный А.М., Полищук Н.Н., Топол И.А. Сальмонелла-индуцированные изменения кишечной микробиоты и транскриптома генов иммунного ответа на фоне введения ванкомицина и *Bacteroides fragilis* // Патология. 2017. Т. 14, № 1 (39). С. 12–19. [Bukina Y.V., Kamyshnyi A.M., Polishchuk N.N., Topol I.A. Salmonella-induced changes in the gut microbiota and immune response genes transcriptome during administration of vancomycin and *Bacteroides fragilis*. *Patologiya = Pathology*, 2017, vol. 14, no. 1 (39), pp. 12–19. (In Russ.)]
2. Agbor T.A., McCormick B.A. Salmonella effectors: important players modulating host cell function during infection. *Cell Microbiol.*, 2011, vol. 13, pp. 1858–1869. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01701.x
3. Arpaia N., Campbell C., Fan X. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*, 2013, vol. 504, pp. 451–455. doi: 10.1038/nature12726
4. Atarashi K., Tanoue T., Ando M., Kamada N., Nagano Y. Th17 cell induction by adhesion of microbes to intestinal epithelial cells. *Cell*, 2015, vol. 163, pp. 367–380. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.058
5. Atarashi K., Tanoue T., Oshima K., Suda W., Nagano Y., Nishikawa H., Fukuda S., Saito T., Narushima S., Hase K. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature*, 2013, vol. 500, pp. 232–236. doi: 10.1038/nature12331
6. 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, pp. 337–341. doi: 10.1126/science.1198469
7. Behnsen J., Perez-Lopez A., Nuccio S.P., Raffatellu M. Exploiting host immunity: the Salmonella paradigm. *Trends Immunol.*, 2015, vol. 36, pp. 112–120. doi: 10.1016/j.it.2014.12.003

8. Breyner N.M., Michon C., de Sousa C.S., Vilas Boas P.B., Chain F., Azevedo V.A., Langella P., Chatel J.M. Microbial anti-inflammatory molecule (MAM) from *Faecalibacterium prausnitzii* shows a protective effect on DNBS and DSS-induced colitis model in mice through inhibition of NF- $\kappa$ B pathway. *Front. Microbiol.*, 2017, vol. 8: 114. doi: 10.3389/fmicb.2017.00114
9. Bukina Yu.V., Varynskyi B.O., Voitovich A.V., Koval G.D., Kaplaushenko A.G., Kamyshnyi O.M. The definition of neutrophil extracellular traps and the concentration of short-chain fatty acids in salmonella-induced inflammation of the intestine against the background of vancomycin and *bacteroides fragilis*. *Pathology*, 2018, vol. 15, no. 1 (42), pp. 10–17.
10. David L.A., Maurice C.F., Carmody R.N., Gootenberg D.B., Button J.E., Wolfe B.E. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 2014, vol. 505, pp. 559–563. doi: 10.1038/nature12820
11. Dubourg G., Lagier J.C., Armougom F., Robert C., Audoly G., Papazian L. High-level colonisation of the human gut by *Verrucomicrobia* following broad-spectrum antibiotic treatment. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2013, vol. 41, pp. 149–155. doi: 10.1371/journal.pone.0095476
12. Ferreira-Halder C.V., Faria A.V.S., Andrade S.S. Action and function of *Faecalibacterium prausnitzii* in health and disease. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 2017, vol. 6, pp. 643–648. doi: 10.1016/j.bpg.2017.09.011
13. Feuerer M., Hill J.A., Kretschmer K., von Boehmer H., Mathis D., Benoist C. Genomic definition of multiple ex vivo regulatory T cell subphenotypes. *Proc. Natl. Acad. Science USA*, 2010, vol. 107, pp. 5919–5924. doi: 10.1073/pnas.1002006107
14. Furusawa Y., Obata Y., Fukuda S. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*, 2013, vol. 504, pp. 446–450. doi: 10.1038/nature12721
15. Geuking M.B., Cahenzli J., Lawson M.A., Ng D.C., Slack E., Hapfelmeier S., McCoy K.D., Macpherson A.J. Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. *Immunity*, 2011, vol. 34, pp. 794–806. doi: 10.1016/j.immuni.2011.03.021
16. Geva-Zatorsky N., Sefik E., Kua L., Pasmán L., Tan T.G., Ortiz-Lopez A., Yanortsang T.B., Yang L., Jupp R., Mathis D., Benoist C., Kasper D.L. Mining the human gut microbiota for immunomodulatory organisms. *Cell*, 2017, vol. 168, no. 5, pp. 928–943. doi: 10.1016/j.cell.2017.01.022
17. Goto Y., Umesaki Y., Benno Y., Kiyono H. Epithelial glycosylation in gut homeostasis and inflammation. *Nat. Immunol.*, 2016, vol. 17, no. 11, pp. 1244–1251. doi: 10.1038/ni.3587
18. Honda K., Littman D.R. The microbiome in infectious disease and inflammation. *Annu. Rev. Immunol.*, 2012, vol. 30, pp. 759–795. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-074937
19. Hooper L.V., Littman D.R., Macpherson A.J. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, 2012, vol. 336, no. 6086, pp. 1268–1273. doi: 10.1126/science.1223490
20. Ivanov I.I., Atarashi K., Manel N., Brodie E.L., Shima T., Karaoz U., Wei D., Goldfarb K.C., Santee C.A., Lynch S.V., Tanoue T., Imaoka A., Itoh K., Takeda K., Umesaki Y., Honda K., Littman D.R. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*, 2009, vol. 139, pp. 485–498. doi: 10.1016/j.cell.2009.09.033
21. Keestra-Gounder A.M., Tsohis R.M., Bäumlér A.J. Now you see me, now you don't: the interaction of *Salmonella* with innate immune receptors. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2015, vol. 13, pp. 206–216. doi: 10.1038/nrmicro3428
22. Korpela K., Flint H.J., Johnstone A.M., Lappi J., Poutanen K., Dewulf E. Gut microbiota signatures predict host and microbiota responses to dietary interventions in obese individuals. *PLoS One*, 2014, vol. 9 (6): e90702. doi: 10.1371/journal.pone.0090702
23. Lathrop S.K., Bloom S.M., Rao S.M., Nutsch K., Lio C.W., Santacruz N., Peterson D.A., Stappenbeck T.S., Hsieh C.S. Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature*, 2011, vol. 478, pp. 250–254. doi: 10.1038/nature10434
24. Li J., Lin S., Vanhoutte P.M., Woo C.W., Xu A. *Akkermansia muciniphila* protects against atherosclerosis by preventing metabolic endotoxemia-induced inflammation in apoE<sup>-/-</sup> mice. *Circulation*, 2016, vol. 133, pp. 2434–2446. doi: 10.1038/nature10434
25. Littman D.R., Rudenski A.Y. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell*, 2010, vol. 140, pp. 845–858. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.021
26. Lopetuso L.R., Scalfaferrri F., Petito V., Gasbarrini A. Commensal *Clostridia*: leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut Pathog.*, 2013, vol. 5 (1): 23. doi: 10.1186/1757-4749-5-23
27. Nagano Y., Itoh K., Honda K. The induction of Treg cells by gut-indigenous *Clostridium*. *Curr. Opin. Immunol.*, 2012, vol. 24, pp. 392–397. doi: 10.1016/j.coi.2012.05.007
28. Ochoa-Reparaz J., Mielcarz D.W., Wang Y., Begum-Haque S., Dasgupta S. A polysaccharide from the human commensal *Bacteroides fragilis* protects against CNS demyelinating disease. *Mucosal Immunol.*, 2010, vol. 3, pp. 487–495. doi: 10.1038/mi.2010.29
29. Ost K.S., Round J.L. Communication between the microbiota and mammalian immunity. *Annu. Microbiol. Rev.*, 2018, vol. 72, pp. 399–422. doi: 10.1146/annurev-micro-090817-062307
30. 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
31. Plovier H., Everard A., Druart C., Depommier C., Van Hul M., Geurts L., Chilloux J., Ottman N., Duparc T., Lichtenstein L., Myridakis A., Delzenne N.M., Klievink J., Bhattacharjee A., van der Ark K.C., Aalvink S., Martínez L.O., Dumas M.E., Maiter D., Loumaye A., Hermans M.P., Thissen J.P., Belzer C., de Vos W.M., Cani P.D. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat. Med.*, 2017, vol. 1, pp. 107–113. doi: 10.1038/nm.4236
32. Quevrain E., Maubert M.A., Michon C., Chain F., Marquant R. Identification of an antiinflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut*, 2016, vol. 65, pp. 415–425. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307649
33. Round J.L., Mazmanian S.K. Inducible Foxp3<sup>+</sup> regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc. Natl. Acad. Science USA*, 2010, vol. 107, pp. 12204–12209. doi: 10.1073/pnas.0909122107
34. Sano T., Huang W., Hall J.A., Yang Y., Chen A. An IL-23R/IL-22 circuit regulates epithelial serum amyloid A to promote local effector Th17 responses. *Cell*, 2015, vol. 163, pp. 381–393. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.061

35. Shin N.R., Lee J.C., Lee H.Y., Kim M.S., Whon T.W., Lee M.S. An increase in the *Akkermansia* spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut*, 2014, vol. 63, pp. 727–735. doi: 10.1136/gutjnl-2012-303839
36. Smith P.M., Howitt M.R., Panikov N. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*, 2013, vol. 341, no. 6145, pp. 569–573. doi: 10.1126/science.1241165
37. Sorini C., Cardoso R.F., Gagliani N., Villablanca E.J. Commensal bacteria-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses in health and disease. *Front. Immunol.*, 2018, vol. 9: 2667. doi: 10.3389/fimmu.2018.02667
38. Tan T.G., Sefik E., Geva-Zatorsky N., Kua L., Naskar D., Teng F., Pasman L., Ortiz-Lopez A., Jupp R., Wu H.J. Identifying species of symbiont bacteria from the human gut that, alone, can induce intestinal Th17 cells in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2016, vol. 113, pp. 8141–8150. doi: 10.1073/pnas.1617460113
39. Telesford K.M., Yan W., Ochoa-Reparaz J., Pant A., Kircher C., Christy M.A., Begum-Haque S., Kasper D.L., Kasper L.H. A commensal symbiotic factor derived from *Bacteroides fragilis* promotes human CD39(+)Foxp3(+) T cells and Treg function. *Gut Microbes.*, 2015, vol. 6, pp. 234–242. doi: 10.1080/19490976.2015.1056973
40. Yang Y., Torchinsky M.B., Gobert M., Xiong H., Xu M. Focused specificity of intestinal TH17 cells towards commensal bacterial antigens. *Nature*, 2014, vol. 510, pp. 152–156. doi: 10.1038/nature13279
41. 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 pathogens. *Nat. Med.*, 2008, vol. 14, pp. 282–289. doi: 10.1038/nm1720
42. Zhou L., Zhang M., Wang Y., Dorfman R.G., Liu H., Yu T., Chen X., Tang D., Xu L., Yin Y., Pan Y., Zhou Q., Zhou Y., Yu C. *Faecalibacterium prausnitzii* Produces butyrate to maintain Th17/Treg balance and to ameliorate colorectal colitis by inhibiting histone deacetylase. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2018, vol. 24, iss. 9, pp. 1926–1940. doi: 10.1093/ibd/izy182

**Авторы:**

**Букина Ю.В.**, ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Запорожского государственного медицинского университета, г. Запорожье, Украина;

**Федонюк Л.Я.**, д.м.н., профессор, зав. кафедры медицинской биологии Тернопольского государственного медицинского университета им. И.Я. Горбачевского, г. Тернополь, Украина;

**Коваль Г.Д.**, д.м.н., профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и эндокринологии Буковинского государственного медицинского университета, г. Черновцы, Украина;

**Шеховцова Ю.А.**, к.м.н., ассистент кафедры внутренней медицины и эндоскопии Харьковского национального медицинского университета, г. Харьков, Украина;

**Камышный А.М.**, д.м.н., профессор, зав. кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Запорожского государственного медицинского университета, г. Запорожье, Украина;

**Губарь А.А.**, к.м.н., доцент кафедры урологии Запорожского государственного медицинского университета, г. Запорожье, Украина;

**Губка В.А.**, д.м.н., доцент, профессор кафедры госпитальной хирургии Запорожского государственного медицинского университета, г. Запорожье, Украина.

**Authors:**

**Bukina Yu.V.**, Assistant Professor, Microbiology, Virology and Immunology Department, Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine;

**Fedoniuk L.Ya.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Medical Biology Department, Gorbachevskij Ternopil State Medical University, Ternopil, Ukraine;

**Koval G.D.**, PhD, MD (Medicine), Professor of Clinical Immunology, Allergology and Endocrinology Department, Bukovinian State Medical University, Chernovtsy, Ukraine;

**Shekhovtsova Iu.O.**, PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Internal Medicine and Endocrinology, Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine;

**Kamyshnyi A.M.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Microbiology, Virology and Immunology Department, Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine;

**Gubar A.O.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Urology Department, Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine;

**Gubka V.O.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor of Hospital Surgery Department, Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine.

# МЕТААНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПЕНТАВАЛЕНТНОЙ ЖИВОЙ ОРАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ТЯЖЕЛЫХ ФОРМ РОТАВИРУСНОГО ГАСТРОЭНТЕРИТА У ДЕТЕЙ

А.А. Косова<sup>1</sup>, Е.С. Башкирова<sup>1</sup>, Т.И. Машин<sup>1</sup>, В.И. Чалапа<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Екатеринбург, Россия

<sup>2</sup> ФБУН Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций, г. Екатеринбург, Россия

**Резюме.** Ротавирусная инфекция имеет убиквитарное распространение и входит в число глобальных проблем мирового здравоохранения. Вакцинация пентавалентной оральной живой вакциной, по данным ряда исследований, является эффективной мерой для профилактики тяжелых форм ротавирусного гастроэнтерита у детей до 3-летнего возраста. Ранее неоднократно проводились рандомизированные плацебо-контролируемые исследования, посвященные данной тематике. Однако в связи с особенностями эпидемиологии ротавирусной инфекции у детей в России был проведен метаанализ в группе риска: среди детей в возрасте до 3 лет при применении полного курса вакцинации единственной вакциной, зарегистрированной на территории Российской Федерации. Поиск производился двумя независимыми рецензорами за период с 1994 по февраль 2019 гг., без ограничений по языку, и осуществлялся в пяти базах данных медицинских и биологических публикаций: РИНЦ, PubMed, Web of Science, MEDLINE, Scopus, а также в оглавлениях тематических журналов и библиографических списках. В метаанализ включались многоцентровые рандомизированные контролируемые исследования, в которых сравнивалась эффективность плацебо и законченного курса вакцинации пентавалентной живой пероральной вакциной против ротавирусной инфекции у детей до 3-х лет. Первичной конечной точкой исследования была частота возникновения тяжелого острого гастроэнтерита у детей по системе оценки Vesikari. Обработка данных и построение лесных графиков для оценки обобщенных результатов производилось в свободно распространяемой программе RevMan 5.3 на сайте Кокрановского сообщества. Реализация метода «trim and fill» осуществлялась при помощи Stata 14.2. В метаанализ были включены 7 оригинальных публикаций, представлявших собой многоцентровые рандомизированные плацебо-контролируемые исследования с двойным ослеплением. Количество участников опытной группы составило 19 384 человека, контрольной — 19 425. Трехкратная вакцинация значительно снижала шанс заболеть тяжелым ротавирусным гастроэнтеритом в опытной группе, по сравнению с контрольной, отношение шанса составило 0,34 [95%, ДИ 0,19–0,60]. В ходе кластерного анализа также был подтвержден протективный эффект от полного курса вакцинации. Групповая оценка эффективности вакцинации против РВИ в странах Африки и Юго-Восточной Азии имела статистически значимые результаты, показатель отношения шансов составил 0,60 [95%, ДИ 0,52–0,70]. При оценке эффективности вакцинации против РВИ в Финляндии показатель отношения

---

**Адрес для переписки:**

Косова Анна Александровна  
620028, Россия, г. Екатеринбург, ул. Репина, 3,  
Уральский государственный медицинский университет.  
Тел.: 8 (343) 214-86-69.  
E-mail: kosova\_anna2003@mail.ru

**Contacts:**

Anna A. Kosova  
620028, Russian Federation, Yekaterinburg, Repina str., 3,  
Ural State Medical University.  
Phone: +7 (343) 214-86-69.  
E-mail: kosova\_anna2003@mail.ru

**Библиографическое описание:**

Косова А.А., Башкирова Е.С., Машин Т.И., Чалапа В.И. Метаанализ эффективности пентавалентной живой оральной вакцины для профилактики тяжелых форм ротавирусного гастроэнтерита у детей // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 4. С. 686–694. doi: 10.15789/2220-7619-MAO-1252

**Citation:**

Kosova A. A., Bashkirova E. S., Mashin T. I., Chalapa V. I. Meta-analysis of the effectiveness of pentavalent live oral vaccine for the prevention of severe forms of rotavirus gastroenteritis in children // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 4, pp. 686–694. doi: 10.15789/2220-7619-MAO-1252

шансов установлен на уровне статистической значимости и составляет 0,07 [95%, ДИ 0,04–0,11]. Полный курс вакцинации пентавалентной живой оральной вакциной против ротавирусной инфекции снижает шанс заболеть тяжелым ротавирусным гастроэнтеритом у детей раннего возраста.

**Ключевые слова:** метаанализ, ротавирусная инфекция, ротавирусный гастроэнтерит, дети, вакцинация, пентавалентная живая оральная вакцина.

## META-ANALYSIS OF THE EFFECTIVENESS OF PENTAVALENT LIVE ORAL VACCINE FOR THE PREVENTION OF SEVERE FORMS OF ROTAVIRUS GASTROENTERITIS IN CHILDREN

Kosova A.A.<sup>a</sup>, Bashkirova E.S.<sup>a</sup>, Mashin T.I.<sup>a</sup>, Chalapa V.I.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Ural State Medical University of the Russian Ministry of Health, Yekaterinburg, Russian Federation

<sup>b</sup> Yekaterinburg Research Institute of Viral Infections, Yekaterinburg, Russian Federation

**Abstract.** Rotavirus infection is ubiquitously distributed and represents a global public health problem. Some studies showed that vaccination with pentavalent oral live vaccine was effective in prevention of severe forms of rotavirus gastroenteritis among children up to 3 years of age. Previous randomized placebo-controlled studies assessing this issue were repeatedly conducted. However, due to the features of the epidemiology of pediatric rotavirus infection in Russia, a meta-analysis was conducted in the risk group — children under the age of 3 years by administering a full vaccination course for a single vaccine registered in the Russian Federation. A search was performed by two independent reviewers covering 1994 to February 2019, without restrictions on language, in five databases on medical and biological publications: Russian Science Citation Index, PubMed, Web of Science, MEDLINE, Scopus, and in contents of thematic journals and bibliographic lists. The meta-analysis included multicenter randomized controlled trials comparing the efficacy of placebo and completed full vaccination course with pentavalent live oral rotavirus vaccine in children under 3 years of age. The primary endpoint of the study was the incidence of severe gastroenteritis among children according to the Vesikari evaluation system. Data processing and generation of forest-plots to evaluate summarized results were carried out by the RevMan 5.3 free software distributed on the Cochrane Community website. The implementation of the “trim and fill” method was performed by using Stata 14.2 software. The meta-analysis consisted of 7 original publications performed as multicenter randomized, placebo-controlled double-blind studies. In the experimental and control group there were enrolled 19,384 and 19,425 subjects, respectively. Three-dose vaccination protocol markedly reduced a risk of infection with severe rotavirus gastroenteritis in the experimental group compared to control group, the odds ratio was 0.34 [95%, CI 0.19–0.60]. Cluster analysis also confirmed the protective effect of the full vaccination course. Group assessment of the vaccination effectiveness against rotavirus infection in countries of Africa and Southeast Asia showed significant protection, the odds ratio was 0.60 [95%, CI 0.52–0.70]. While evaluating the effectiveness of vaccination against rotavirus infection in Finland, the odds ratio was set at the level of statistical significance and reached 0.07 [95%, CI 0.04–0.11]. Thus, a full vaccination course with pentavalent live oral vaccine against rotavirus infection lowers a risk of developing severe rotavirus gastroenteritis in young children.

**Key words:** meta-analysis, rotavirus infection, rotavirus gastroenteritis, children, vaccination, pentavalent vaccine.

## Введение

Ротавирусная инфекция (РВИ) является глобальной проблемой мирового здравоохранения. Ежегодно в мире регистрируется более 130 млн случаев заболевания, в Российской Федерации в структуре острых кишечных инфекций РВИ достигает 87% [6]. РВИ характеризуется убиквитарным распространением. Опыт мировых исследований указывает на то, что большинство детей до двухлетнего возраста в анамнезе имеют минимум один эпизод ротавирусного гастроэнтерита. [1, 3, 4, 8]. По данным официальной статистики, в России в 2017 г. заболеваемость ротавирусным гастроэнтеритом составила 80,89 на 100 000 населения, что выше среднемноголетнего уровня в 1,2 раза [6]. Наиболее активно в эпидемический процесс вовлекается детское население, в первую очередь дети в возрасте

до 3 лет [1]. В России для профилактики РВИ зарегистрирована только одна пентавалентная живая вакцина для перорального приема [2]. В настоящее время накоплен большой опыт применения данной вакцины, что позволяет провести метаанализ.

Цель исследования — оценить эффективность полного курса вакцинации детей пентавалентной живой оральной вакциной против ротавирусной инфекции для профилактики тяжелых форм ротавирусного гастроэнтерита путем метаанализа рандомизированных плацебо-контролируемых многоцентровых исследований с двойным ослеплением.

## Материалы и методы

Данное исследование выполнено по заранее письменно оформленному протоколу, включав-

шему полный перечень критериев отбора оригинальных публикаций в соответствии с требованиями инструкции «Предпочтительные параметры отчетности для систематических обзоров и метаанализа (PRISMA)» [14]. Дизайн проведенного исследования представлен в блок-схеме (рис. 1). Поиск статей осуществлялся в пяти базах данных медицинских и биологических публикаций: РИНЦ, PubMed, Web of Science, MEDLINE, Scopus, а также в оглавлениях тематических журналов и библиографических списках по следующим ключевым словам: «пятивалентная ротавирусная вакцина», «пентавалентная ротавирусная вакцина», «РКИ», «двойное ослепление», «pentavalent rotavirus vaccine», «PRV», «RCT», «double-blind». Поиск производился двумя независимыми рецензорами за период с 1994 по февраль 2019 гг., без ограничений по языку. Выбор вакцины был обусловлен тем, что в государственном реестре лекарственных средств Российской Федерации зарегистрирована только одна вакцина: ЛП-001865 вакцина для профилактики ротавирусной инфекции, пентавалентная, живая [2].

В метаанализ включались многоцентровые рандомизированные контролируемые исследования (РКИ), в которых сравнивалась эффективность плацебо и законченного курса вакцинации пентавалентной живой пероральной вакциной против ротавирусной инфекции у детей до 3-х лет. В качественный и количественный синтез включались только публикации, в которых имелось указание на применение системы Vesikari (VSS) для определения тяжести ротавирусного гастроэнтерита. VSS является инструментом для верификации эффективности и действенности ротавирусных вакцин, которая включает в себя оценку показателей: понос (максимальная кратность стула в день, длительность диареи в днях), рвота (максимальная кратность эпизодов рвоты в день, длительность рвоты в днях), максимальная температура тела, степень обезвоживания.

Во всех отобранных публикациях первичной конечной точкой исследования была частота возникновения тяжелого острого гастроэнтерита у детей по системе оценки VSS.

Отбор оригинальных публикаций проводился исследователями независимо друг от друга. При возникновении разногласий информация проверялась повторно и коллегиально обсуждалась с целью достижения консенсуса. По всем полученным данным достигнуто согласие. Все включенные в метаанализ исследования полностью соответствовали критериям протокола и были выполнены по единой методике.

Извлечение данных из оригинальных публикаций производилось также двумя исследователями независимо друг от друга. При этом

отбиралась следующая информация: дата публикации, место проведения исследования, количество участников в экспериментальной и контрольной группах, количество заболевших тяжелым ротавирусным гастроэнтеритом среди вакцинированных 3-кратно и среди привитых плацебо, модель исследования, маскировка данных и тип вмешательства. Данные об исходах были представлены абсолютными показателями в экспериментальной и контрольной группах. Проверка результатов абстрагирования проводилась двумя исследователями перекрестно.

Согласно принципам Кокрановского руководства по систематическим обзорам медицинских вмешательств [20], была выполнена оценка рисков системной ошибки и качества методологии исследований, включенных в анализ.

Чтобы оценить эффективность применения пентавалентной пероральной живой вакцины против РВИ, удовлетворявшие требованиям протокола исследования были объединены для обобщенной оценки.

Обработка данных и построение лесных графиков для оценки обобщенных результатов производилось в свободно распространяемой на сайте Кокрановского сообщества программе RevMan 5.3. Степень неоднородности исследований измерялась при помощи показателя гетерогенности  $I^2$ . Значение  $I^2 < 25\%$  принималось свидетельством низкого уровня неоднородности,  $I^2$  в интервале от 25 до 50% считался показателем умеренной гетерогенности, а  $I^2 > 50\%$  означал высокую неоднородность [5]. В качестве меры статистической значимости выявленной гетерогенности использовался критерий  $\chi^2$ . При  $P < 0,10$  выявленная гетерогенность принималась как статистически значимая [5]. При высокой гетерогенности результатов отношение шансов (ОШ) рассчитывалось методом обратной дисперсии с нефиксированными исходами по ОШ с ДИ 95%. Если наблюдалась низкая неоднородность результатов, применялся метод Мантела–Ханзела с фиксированными исходами.

Риск публикационного смещения оценивался путем построения воронкообразной диаграммы рассеяния, в том числе с использованием метода «trim and fill», реализованного в программе Stata 14.2. Симметричность диаграммы учитывалась в качестве свидетельства о наличии низкого риска публикационного смещения.

Оценка нулевой гипотезы осуществлялась при помощи Z-теста, при этом величина показателя, удовлетворявшая условию « $< -1,96$  или  $> +1,96$ » при  $P < 0,050$ , считалась основанием для принятия альтернативной гипотезы.

Работа выполнена на базе кафедры эпидемиологии, социальной гигиены и организации госсанэпидслужбы ФГБОУ ВО Уральский го-

сударственный медицинский университет МЗ РФ в качестве инициативной научно-исследовательской работы без привлечения дополнительного финансирования. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Результаты

Глубина поиска публикаций составила 26 лет. В ходе исследования было найдено 609 публикаций (рис. 1). После удаления дубликатов из 547 работ, по ранее описанному алгоритму были исключены все публикации, не соответствовавшие критериям отбора, заявленным в утвержденном протоколе исследования. В качественном и количественном синтезе участвовали 7 оригинальных работ. Характеристика публикаций, включенных в метаанализ, приведена в таблице 1.

Во всех исследованиях численность опытной и контрольной групп была равнозначной и сопоставимой. В отобранных исследованиях

численность опытной группы варьировалась от 380 до 10 367 человек, в контрольной от 381 до 10 365.

Каждое исследование оценивалось по следующим критериям: генерация случайной последовательности, сокрытие распределения, маскировка данных для участников исследования и персонала, маскировка оценки исхода, неполные данные об исходе, избирательное предоставление данных в отчетах, другие системные ошибки. По каждому критерию статье присваивался низкий, неизвестный или высокий риск системной ошибки в зависимости от того, насколько полно была представлена информация в анализируемых оригинальных публикациях. Результаты оценки рисков системной ошибки представлены в таблице (табл. 2).

В процессе анализа отмечено, что большинство авторов не указало, каким образом производились рандомизация и ее сокрытие от участников, как проводилось ослепление, маскировка результатов от оценщиков, прин-

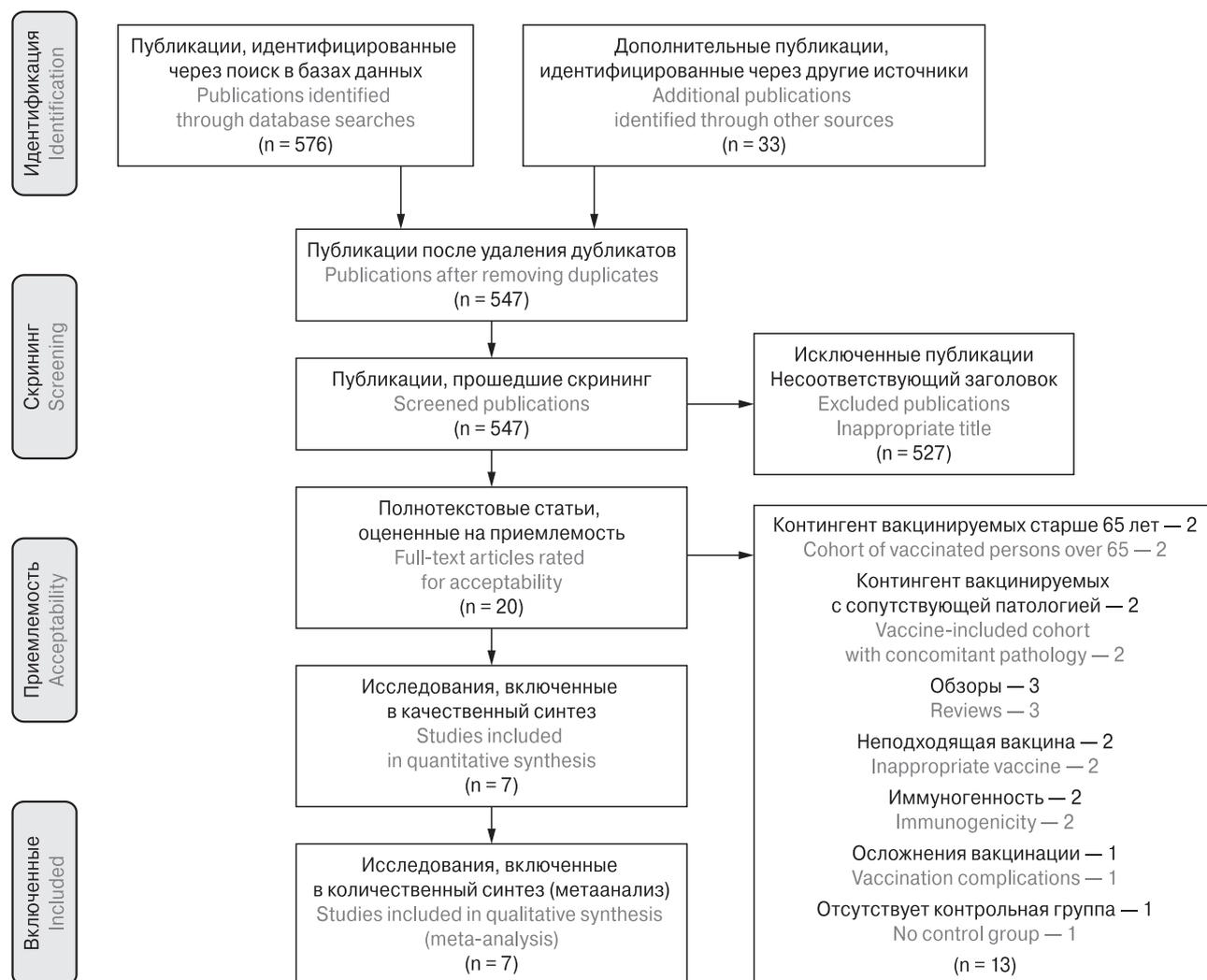


Рисунок 1. Блок-схема PRISMA метаанализа

Figure 1. PRISMA flow diagram of meta-analysis

**Таблица 1. Характеристика публикаций**

Table 1. Characteristics of publications

Название Title	Год Year	Участники Participants		Случаи тяжелого РГ <sup>1</sup> Cases of severe RG <sup>1</sup>		Многоцентровое РКИ Multicenter RCT	Двойное ослепление Double-blind	PRV в сравнении с плацебо PRV versus placebo
		PRV <sup>2</sup>	Контроль Control	PRV	Контроль Control			
K. Zaman et al. [24]	2010	1009	1007	65	109	+	+	+
M.D. Tapia et al. [20]	2012	2357	2348	79	129	+	+	+
R.F. Breiman et al. [10]	2012	3348	3326	117	200	+	+	+
S.O. Sow et al. [19]	2012	823	825	48	58	+	+	+
S. Iwata et al. [12]	2013	380	381	14	55	+	+	+
T. Vesikari et al. [22]	2010	10367	10365	19	264	+	+	+
T. Vesikari et al. [23]	2010	1100	1173	1	23	+	+	+

**Примечания.** <sup>1</sup>РГ — ротавирусный гастроэнтерит; <sup>2</sup>PRV — группа, прошедшая полный курс вакцинации против ротавирусной инфекции; «+» — статья соответствует вышеуказанному критерию.

Notes. <sup>1</sup>RG — rotavirus gastroenteritis; <sup>2</sup>PRV — group complete vaccination against rotavirus infection; «+» — the article meets the above criteria.

цип представления данных. В процессе изучения оригинальных публикаций отмечен и ряд других системных ошибок. Две работы имели «низкий риск системной ошибки и высокое качество». Пять оригинальных публикаций были классифицированы нами как «исследования среднего качества и неизвестного риска системной ошибки» ввиду неполного описания модели исследования и отсутствия информации о наличии риска системной ошибки. Весь пул отобранных для количественного анализа оригинальных публикаций имеет умеренный риск системной ошибки.

В метаанализ были включены исследования, проведенные в странах Африки (Гана, Кения, Мали), Вьетнаме, Бангладеш, Японии и Финляндии. В итоге объединенная опытная группа составила 19 384 человека, контрольная — 19 425 (рис. 2).

Обобщенный показатель отношения шансов составил 0,34 [95%, ДИ 0,19–0,60]. Величина полученного расчетным путем показателя находится на уровне статистической значимости. Отмечен высокий уровень индекса гетерогенности (93%). Величина критерия  $\chi^2$  (88,60,  $P < 0,10$ ) свидетельствует о высоком уровне статистической значимости выявленной неоднородности обобщенных результатов. В ходе анализа полученного Z-теста (3,72,  $P = 0,0002$ ) нулевая гипотеза была отвергнута (рис. 2).

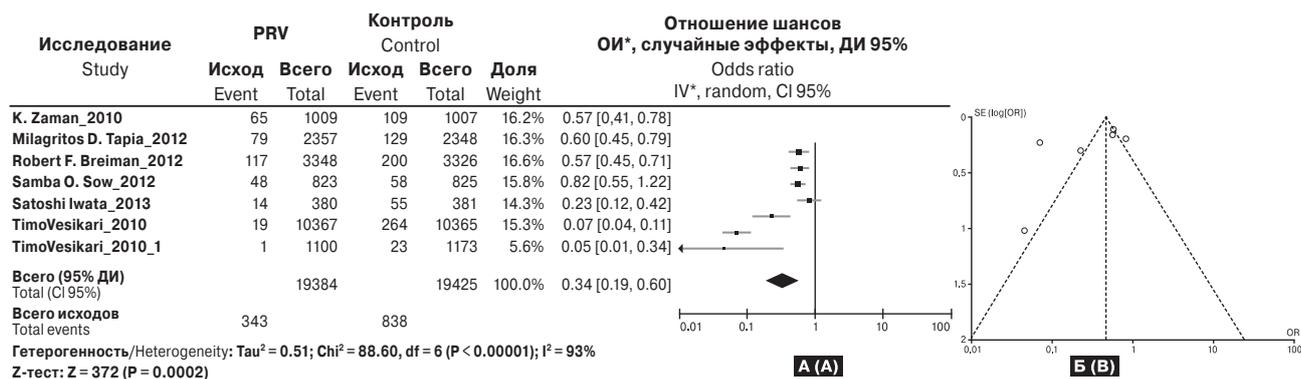
Несимметричное распределение исследований на воронкообразном графике указывает на наличие высокого риска публикационного смещения (рис. 2).

В связи с этим было принято решение провести кластерную оценку данных, разделив исследования на 2 группы. В первую группу вошли работы из стран Африки и Юго-Восточной

**Таблица 2. Оценка рисков системной ошибки в публикациях, включенных в метаанализ**

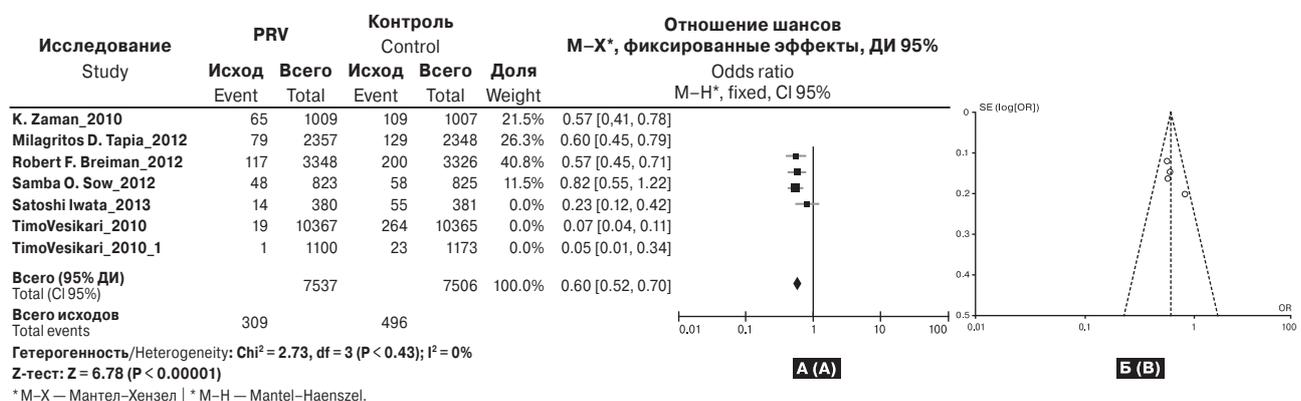
Table 2. Risk assessment of system error in publications included in the meta-analysis

Название Title	Генерация случайности последовательности Random sequence generation	Скрытие распределения Allocation concealment	Маскировка данных для участников исследования и персонала Blinding of participants and personnel	Маскировка оценки исхода Blinding of outcome assessment	Неполные данные об исходе Incomplete outcome data	Избирательное предоставление данных в отчетах Selective reporting	Другие системные ошибки Other bias
K. Zaman et al. [24]	+	+	+	?	+	+	+
M.D. Tapia et al. [20]	?	?	?	?	-	?	-
R.F. Breiman et al. [10]	?	?	?	-	-	+	+
S.O. Sow et al. [19]	?	?	?	-	+	+	-
S. Iwata et al. [12]	+	+	+	?	+	+	+
T. Vesikari et al. [22]	?	?	?	?	-	+	?
T. Vesikari et al. [23]	?	?	?	?	-	+	?



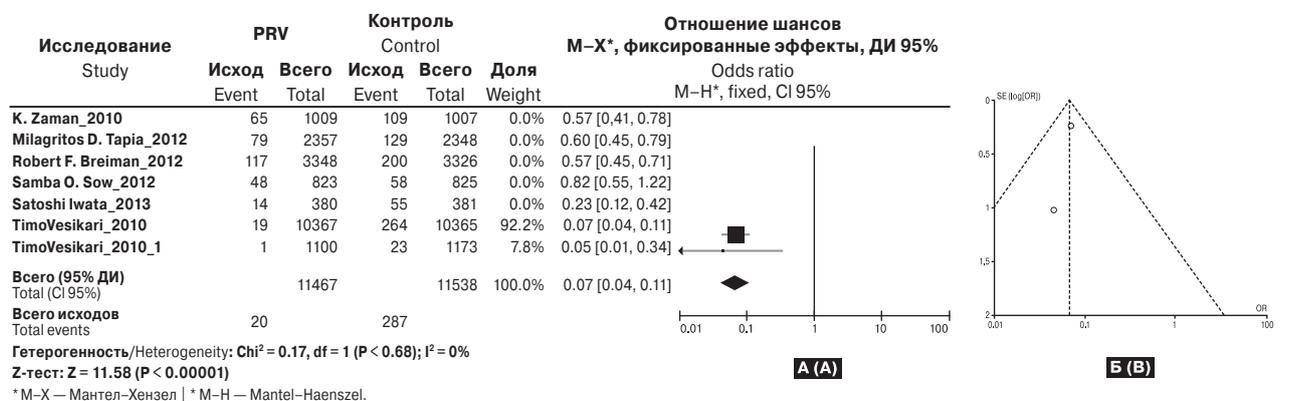
**Рисунок 2. Результаты метаанализа эффективности вакцинации против РВИ (95% ДИ): А) лесной график; Б) воронкообразный график**

Figure 2. Results of a meta-analysis of the effectiveness of vaccination against RVI (95% CI): A) forest-plot; B) funnel-plot



**Рисунок 3. Результаты метаанализа эффективности вакцинации против РВИ в странах Африки и Юго-Восточной Азии (95% ДИ): А) лесной график; Б) воронкообразный график**

Figure 3. The results of a meta-analysis of the effectiveness of vaccination against RVI in Africa and Southeast Asia (95% CI): A) forest-plot; B) funnel-plot



**Рисунок 4. Результаты метаанализа эффективности вакцинации против РВИ в Финляндии (95% ДИ): А) лесной график; Б) воронкообразный график**

Figure 4. The results of a meta-analysis of the effectiveness of vaccination against RVI in Finland (95% CI): A) forest-plot; B) funnel-plot

Азии, во вторую группу — исследования, проведенные в Финляндии. РКИ, проведенное в Японии, было исключено из кластерного анализа в связи со значительным повышением индекса гетерогенности за счет этого исследования при проведении процедуры кумулятивного метаанализа.

При кластерной оценке эффективности вакцинации против РВИ в странах Африки и Юго-Восточной Азии показатель отношения шансов составил 0,60 [95%, ДИ 0,52–0,70], и он является статистически значимым. Величина  $I^2$  (0%) и критерий  $\chi^2$  (2,73,  $P = 0,43$ ) свидетельствуют о высоком уровне однородности обобщенных исследований. Полученное значение Z-теста (6,78,  $P < 0,00001$ ) является основанием для принятия альтернативной гипотезы (рис. 3).

По результатам применения алгоритма «Trim and fill» выявлено отсутствие системной ошибки обобщаемых работ. Симметричное распределение исследований на воронкообразном графике указывает на наличие низкого риска публикационного смещения (рис. 3).

При оценке эффективности вакцинации против РВИ в Финляндии показатель отношения шансов установлен на уровне статистической значимости и составляет 0,07 [95%, ДИ 0,04–0,11]. Обобщенные исследования характеризуются низким уровнем гетерогенности ( $I^2 = 0\%$ ,  $\chi^2 = 0,17$ , при  $P = 0,68$ ). Полученное значение Z-теста (11,58,  $P < 0,00001$ ) является основанием для принятия альтернативной гипотезы (рис. 4).

Согласно данным, полученным при проведении процедуры «trim and fill», выявлено отсутствие системной ошибки обобщаемых работ. Симметричное распределение исследований на воронкообразном графике указывает на наличие низкого риска публикационного смещения (рис. 4).

## Обсуждение

В настоящее время в Российской Федерации актуальна проблема вакцинопрофилактики ротавирусной инфекции. Она обусловлена рядом факторов: высоким уровнем заболеваемости, в первую очередь, детей; недоверием родителей к эффективности прививок; относительно высокой стоимостью процедуры и т. п. Тем не менее наиболее эффективным средством массовой профилактики РВИ является вакцинация.

Многие регионы РФ уже включили РВИ в региональные календари профилактических прививок, а к 2020 г., согласно распоряжению Правительства Российской Федерации, планируется внедрение вакцинации против данного заболевания в Национальный календарь профилактических прививок [7].

Все известные систематические обзоры и метаанализы, посвященные вопросам профилактики РВИ, опубликованные в последнее десятилетие, в основном рассматривают эффективность препаратов, не включенных в государственный реестр лекарственных средств, разрешенных к применению на территории Российской Федерации [12, 13, 15, 16].

Все имеющиеся исследования обобщают результаты оценки эффективности вакцинации у широких возрастных групп детей, в качестве критерия включения учитывают возраст детей в опытной и контрольной группах до 5 лет и старше. Таким образом, оценка эффективности единственной зарегистрированной в России вакцины для специфической профилактики РВИ в этих работах представлена с иной комбинацией критериев включения/исключения.

В то же время в Российской Федерации в 2018 г. наиболее высокий показатель заболеваемости РВИ отмечен у детей в возрасте от 1 до 2 лет [6]. В ряде регионов показатели инцидентности у детей раннего возраста (до 3 лет) превышают таковые в старших возрастных группах более чем в 25 раз. В связи с этим в выполненный нами метаанализ были включены только оригинальные исследования, в которых возраст участников РКИ не превышал 3 лет, что является отличительной характеристикой данного исследования.

В ранее проведенных работах подобного типа [13, 15, 16] в качестве критерия оценки эффективности использовалась частота госпитализации и обращения за медицинской помощью. Однако сам факт госпитализации или обращения за медицинской помощью не является объективным критерием оценки тяжести возникшего заболевания. В связи с этим в нашем исследовании в качестве критерия оценки эффективности вакцинации использовалось только возникновение тяжелых форм ротавирусного гастроэнтерита, при этом учитывались лишь оригинальные публикации с указанием на применение унифицированной системы оценки VSS.

Все вышесказанное явилось основанием для проведения оценки эффективности единственного зарегистрированного в России препарата для специфической профилактики ротавирусного ГЭ.

В ходе проведения исследования в качестве нулевой гипотезы нами был принят тезис о том, что вакцинопрофилактика не эффективна. Результаты метаанализа подтверждают наличие протективного эффекта у детей от полного курса вакцинации пентавалентной оральной живой вакциной против ротавирусной инфекции. При количественном анализе обобщенных результатов отношение шансов свидетельство-

вало о том, что вероятность заболеть в группе трехкратно вакцинированных была достоверно ниже, чем в группе привитых плацебо, что согласуется с результатами проведенных ранее исследований другими авторами [12, 13, 15, 16, 17].

При кластерном анализе было выделено две условных группы стран с высоким и низким уровнем смертности и доходов населения. При этом по результатам обобщенной оценки в обоих кластерах нулевая гипотеза была отвергнута. В обеих группах стран показана эффективность полного курса вакцинации. Полученные значения отношения шансов свидетельствуют о том, что вероятность возникновения тяжелых случаев ротавирусного гастроэнтерита в опытной группе ниже, чем в контрольной. При этом в странах с высоким уровнем дохода вероятность тяжелой формы заболевания на фоне полного курса вакцинации в 14,3 раза ниже. В странах с высокой смертностью населения и низкими доходами показатель отношения шансов в 8,4 раза меньше. Таким образом, вакцинация предотвратила 93% слу-

чаев тяжелого ротавирусного гастроэнтерита в Финляндии и 38% в странах Африки и Юго-Восточной Азии.

## Заключение

В результате метаанализа показан выраженный протективный эффект полного курса вакцинации пентавалентной живой оральной вакциной против РВИ. Трехкратная аппликация препарата значительно снижает вероятность возникновения тяжелых форм острого ротавирусного гастроэнтерита у детей раннего возраста. Учитывая выявленную связь эффективности вакцинопрофилактики с уровнем экономического развития страны, имеются основания предполагать потенциально высокую результативность иммунопрофилактики РВИ в Российской Федерации. В связи с этим целесообразно безотлагательное введение в Национальный календарь прививок России обязательной вакцинации против данной инфекции.

## Список литературы/References

1. Баранов А.А., Намазова-Баранова Л.С., Таточенко В.К., Вишнева Е.А., Федосеенко М.В., Селимзянова Л.Р., Лобзин Ю.В., Харит С.М., Бехтерева М.К., Брико Н.И., Миндлина А.Я., Кудрявцев В.В., Горелов А.В., Подколзин А.Т., Костинов М.П. Вакцинопрофилактика ротавирусной инфекции у детей: Федеральные клинические рекомендации. М.: ПедиатрЪ, 2016. 40 с. [Baranov A.A., Namazova-Baranova L.S., Tatchenko V.K., Vishneva E.A., Fedoseenko M.V., Salimzjanova R.L., Lobzin Yu.V., Harith S.M., Bekhtereva M.K., Brico N.I., Mindlin A.Ya., Kudryavtsev V.V., Gorelov A.V., Podkolzin A.T., Kostinov M.P. Vaccine prophylaxis of rotavirus infection in children: Federal clinical guidelines. *Moscow: Pediatrician*, 2016. 40 p. (In Russ.)]
2. Государственный реестр лекарственных средств Российской Федерации. [State register of medicinal products of the Russian Federation]. URL: [https://grls.rosminzdrav.ru/Grls\\_View\\_v2.aspx?routingGuid=ef8ec329-91e8-4e91-b8df-c8759e2f3d3c&t=09.07.2019](https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=ef8ec329-91e8-4e91-b8df-c8759e2f3d3c&t=09.07.2019)
3. Косова А.А., Чалапа В.И. Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи, в стационарах России: опыт мета-анализа заболеваемости // Здоровье населения и среда обитания. 2018. № 12. С. 57–64. [Kosova A.A., Chalapa V.I. Infections associated with giving medical care in hospitals of Russia: experience of meta-analysis of morbidity. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya = Human Health and The Environment Inhabitation*, 2018, no. 12, pp. 57–64. (In Russ.)]
4. Лукьянова А.М., Бехтерева М.К., Птичникова Н.Н. Клинико-эпидемиологическая характеристика вирусных диарей у детей // Журнал инфектологии. 2014. № 6 (1). С. 60–66. [Lukjanova A.M., Bekhtereva M.K., Ptichnikova N.N. Clinical and epidemiological characteristic viral diarrhea in children. *Zhurnal infektologii = Journal of Infectology*, 2014, no. 6 (1), pp. 60–66. doi: 10.22625/2072-6732-2014-6-1-60-66 (In Russ.)]
5. Омеляновский В.В., Авксентьева М.В., Сура М.В., Хачатрян Г.Р., Федяева В.К. Методические рекомендации по проведению метаанализа. М.: ФГБУ «Центр экспертизы и контроля качества медицинской помощи», 2017. С. 28. [Omelyanovsky V.V., Avksentyeva M.V., Sura M.V., Khachatryan G.R., Fedyeva V.K. Guidelines for the meta-analysis. *Moscow: Center for Examination and Quality Control of Medical Care*, 2017. 28 p. (In Russ.)]
6. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2017 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2018. 268 с. [On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2017: State report. *Moscow: Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare*, 2018. 268 p.]
7. План основных мероприятий на 2018–2020 годы в рамках Десятилетия детства: распоряжение правительства Российской Федерации от 6 июля 2018 года № 1375-п. [The plan of the main events for 2018–2020 in the framework of the Decade of childhood: ordinance of the Government of the Russian Federation of July 6, 2018 No. 1375-p.]. URL: [http://www.consultant.ru/document/cons\\_doc\\_LAW\\_301904/119d657dfcd17a434f287c95d3568b3b0e484daa](http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_301904/119d657dfcd17a434f287c95d3568b3b0e484daa) (09.07.2019)
8. Харит С.М., Бехтерева М.К., Лобзин Ю.В., Рудакова А.В., Подколзин А.Т., Тикунов Н.В. Оценка бремени ротавирусных гастроэнтеритов как обоснование необходимости плановой вакцинации // Медицинский совет. 2017. № 4. С. 73–78. [Harit S.M., Bekhtereva M.K., Lobzin Yu.V., Rudakova A.V., Podkolzin A.T., Tikunov N.V. The burden of rotavirus gastroenteritis, as the rationale for routine vaccination. *Meditsinskii sovet = Medical Council*, 2017, no. 4, pp. 73–78. doi: 10.21518/2079-701X-2017-4-73-78 (In Russ.)]
9. Breimana R.F., Zamanb K., Armahc G., Sowd S.O., Anhf D.D., Victorg J.C., Hille D., Ciarlet M., Neuzilg K.M. Analyses of health outcomes from the 5 sites participating in the Africa and Asia clinical efficacy trials of the oral pentavalent rotavirus vaccine. *Vaccine*, 2012, no. 30S, pp. A24–A29. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.08.124

10. Higgins J.P., Thompson S.G. Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. *Stat. Med.*, 2002, vol. 21, pp. 1539–1558. doi: 10.1002/sim.1186
11. Iwata S., Nakata S., Ukae S., Koizumi Y., Morita Y., Kuroki H., Tanaka Y., Shizuya T., Schödel F., Brown M.L., Lawrence J. Efficacy and safety of pentavalent rotavirus vaccine in Japan: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2013, vol. 9, iss. 8, pp. 1626–1633. doi: 10.4161/hv.24846
12. Jonesteller C.L., Burnett E., Yen C., Tate J.E. Effectiveness of rotavirus vaccination: A systematic review of the first decade of global postlicensure data, 2006–2016 (Review). *Clin. Infect. Dis.*, 2017, vol. 65, iss. 5, pp. 840–850. doi: 10.1093/cid/cix369
13. Karafillakis, E., Hassounah, S., Atchison, C. Effectiveness and impact of rotavirus vaccines in Europe, 2006–2014. *Vaccine*, 2015, vol. 33, iss. 18, pp. 2097–2107 doi: 10.1016/j.vaccine.2015.03.016
14. Moher D., Liberati A., Tetzlaff J., Altman D.G. The PRISMA Group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Open. Med.*, 2009, vol. 3, pp. 123–130. doi: 10.1371/journal.pmed.1000097
15. Rosettie K.L., Vos T., Mokdad A.H., Flaxman A.D., Khalil I., Troeger C., Weaver M.R. Indirect rotavirus vaccine effectiveness for the prevention of rotavirus hospitalization: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2018, vol. 98, iss. 4, pp. 1197–1201. doi: 10.4269/ajtmh.17-0705
16. Shakerian-Rostami S., Moradi-Lakeh M., Esteghamati A., Mobinizadeh M., Shokraneh F., Babashahi S., Yaghoubi M. The efficacy and safety of rotavirus vaccine in children under the five years of age; systematic review and meta-analysis. *J. Isfahan Med. School*, 2014, vol. 32, iss. 303, pp. 1605–1622.
17. Soares-Weiser K., Maclehoose H., Ben-Aharon I., Goldberg E., Pitan F., Cunliffe N. Vaccines for preventing rotavirus diarrhoea: vaccines in use. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2010, vol. 5: CD008521. doi: 10.1002/14651858.CD008521.pub3
18. Sow S.O., Tapia M., Haidara F.C., Ciarlet M., Diallo F., Kodio M., Doumbia M., Dembélé R.D., Traoré O., Onwuchekwa U.U., Lewis K.D.C., Victor J.C., Steele A.D., Neuzil K.M., Kotloff K.L., Levine M.M. Efficacy of the oral pentavalent rotavirus vaccine in Mali. *Vaccine*, 2012, no. 30S, pp. A71–A78. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.11.094
19. Tapia M.D., Armah G., Breiman R.F., Dallas M.J., Lewis K.D., Sow S.O., Rivers S.B., Levine M.M., Laserson K.F., Feikin D.R., Victor J.C., Ciarlet M., Neuzil K.M., Steele A.D. Secondary efficacy endpoints of the pentavalent rotavirus vaccine against gastroenteritis in sub-Saharan Africa. *Vaccine*, 2012, no. 30S, pp. A79–A85. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.01.022
20. The Cochrane Collaboration. Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions. URL: <https://training.cochrane.org/handbook> (09.07.2019)
21. Vesikari T., Karvonen A., Ferrante S.A., Ciarlet M. Efficacy of the pentavalent rotavirus vaccine, RotaTeq®, in Finnish infants up to 3 years of age: the finnish extension study. *Eur. J. Pediatr.*, 2010, no. 169, pp. 1379–1386. doi: 10.1007/s00431-010-1242-3
22. Vesikari T., Itzler R., Karvonen A., Korhonen T., Van Damme P., Behre U., Bona G., Gothefors L., Heaton P.M., Dallas M., Goveia M.G. RotaTeq®, a pentavalent rotavirus vaccine: efficacy and safety among infants in Europe. *Vaccine*, 2010, no. 28, pp. 345–351. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.10.041
23. Zaman K., Anh D.D., Victor J.C., Shin S., Yunus Md., Dallas M.J., Podder G., Thiem V.D., Mai L.T.P., Luby S.P., Tho L.H., Coia M.L., Lewis K., Rivers S.B., Sack D.A., Schödel F., Steele A.D., Neuzil K.M., Ciarlet M. Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in Asia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, 2010, no. 376, pp. 615–623. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60755-6

**Авторы:**

**Косова А.А.**, к.м.н., доцент, и.о. зав. кафедрой эпидемиологии, социальной гигиены и организации госсанэпидслужбы ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Екатеринбург, Россия;

**Башкирова Е.С.**, врач-эпидемиолог кафедры эпидемиологии, социальной гигиены и организации госсанэпидслужбы ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Екатеринбург, Россия;

**Машин Т.И.**, врач-эпидемиолог кафедры эпидемиологии, социальной гигиены и организации госсанэпидслужбы ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Екатеринбург, Россия;

**Чалапа В.И.**, врач-эпидемиолог ФБУН Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций, г. Екатеринбург, Россия.

**Authors:**

**Kosova A.A.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Epidemiology, Social Hygiene and Organization of State Sanitary and Epidemiological Services, Yekaterinburg, Russian Federation;

**Bashkirova E.S.**, Epidemiologist, Department of Epidemiology, Social Hygiene and Organization of State Sanitary and Epidemiological Services, Yekaterinburg, Russian Federation;

**Mashin T.I.**, Epidemiologist, Department of Epidemiology, Social Hygiene and Organization of State Sanitary and Epidemiological Services, Yekaterinburg, Russian Federation;

**Chalapa V.I.**, Epidemiologist, Yekaterinburg Research Institute of Viral Infections, Yekaterinburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 19.07.2019  
Отправлена на доработку 13.02.2020  
Принята к печати 11.03.2020

Received 19.07.2019  
Revision received 13.02.2020  
Accepted 11.03.2020

# БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВОЗМОЖНОЙ ПРИЧИНЫ ПЕРЕКРЕСТНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АНТИТЕЛ С АНТИГЕНАМИ, ПРИНАДЛЕЖАЩИМИ К РАЗНЫМ ПАТОГЕННЫМ ТИПАМ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА

А.С. Столбиков<sup>1,2</sup>, Р.К. Салаяев<sup>1</sup>, Н.И. Рекославская<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, Россия

<sup>2</sup> Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия

<sup>3</sup> Иркутский научный центр СО РАН, г. Иркутск, Россия

**Резюме.** Вирус папилломы человека (ВПЧ) относится к группе чрезвычайно распространенных вирусных инфекций, передающихся преимущественно половым путем. Вирус папилломы человека вызывает рак шейки матки, который является четвертой по распространенности формой рака у женщин. В 2012 г. было зафиксировано 266 тыс. смертей и 528 тыс. новых случаев. На сегодняшний день в мире созданы 3 профилактические вакцины против ВПЧ — двухвалентная «Церварикс», четырехвалентная «Гардасил» и девятивалентная «Гардасил-9». В процессе научного исследования этих вакцин выяснилось, что они способны индуцировать выработку антител к типам ВПЧ, антигенные белки которых не содержатся в составе вакцинного препарата. Причины такого перекрестного взаимодействия антител с антигенами, принадлежащими к разным патогенным типам ВПЧ, не определены. Данная работа посвящена попытке с помощью биоинформационных методов найти вероятное объяснение перекрестного взаимодействия антител к одним типам вирусов с антигенами других. Это даст возможность в будущем оптимизировать процесс создания кандидатных вакцин и получать более эффективные поливалентные иммунобиологические препараты против ВПЧ. В исследовании нами использованы аминокислотные последовательности белка L1 оболочки вирусов ВПЧ 4 наиболее онкогенных типов (16, 18, 31, 45). Последовательности были извлечены из международной базы данных NCBI (National Center for Biotechnology Information) и выровнены в программе «Clustal Omega» и в редакторе «BioEdit». Поиск и анализ потенциальных антигенных детерминант мы проводили с помощью программ «VepiPred-2.0: Sequential B-Cell Epitope Predictor», «DiscoTope 2.0 Server», «SYFPEITHI». Результаты биоинформационного исследования выявили значительный потенциал перекрестного взаимодействия антител с антигенами, принадлежащими к патогенным типам ВПЧ (16, 18, 31, 45) за счет сходства антигенных детерминант. Были обнаружены общие линейные детерминанты для Т-клеток и В-клеток у всех 4 типов вирусных белков L1. Также обнаружены сходные трехмерные антигенные детерминанты для В-клеток у ВПЧ16 L1 и ВПЧ18 L1. Антигенные

---

**Адрес для переписки:**

Столбиков Алексей Сергеевич  
664033, Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,  
Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН.  
Тел.: 8 (3952) 42-46-59. Факс: 8 (3952) 51-07-54.  
E-mail: valkir5@yandex.ru

**Contacts:**

Aleksey S. Stolbikov  
664033, Russian Federaton, Irkutsk, Lermontov str., 132,  
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS.  
Phone: +7 (3952) 42-46-59. Fax: +7 (3952) 51-07-54.  
E-mail: valkir5@yandex.ru

**Библиографическое описание:**

Столбиков А.С., Салаяев Р.К., Рекославская Н.И. Биоинформатический анализ возможной причины перекрестного взаимодействия антител с антигенами, принадлежащими к разным патогенным типам вируса папилломы человека // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 4. С. 695–706. doi: 10.15789/2220-7619-TBA-1263

**Citation:**

Stolbikov A.S., Salyaev R.K., Rekoslavskaya N.I. Bioinformatics analysis of putative causes for cross-reactive antibodies interacting with antigens derived from various pathogenic human papillomaviruses // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 4, pp. 695–706. doi: 10.15789/2220-7619-TBA-1263

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Иркутской области в рамках научного проекта № 20-44-380001.

детерминанты ВПЧ16 L1 и ВПЧ31 L1 более близки друг другу. Сходство наблюдается между ВПЧ18 L1 и ВПЧ45 L1. Поэтому при иммунизации ВПЧ16 L1 стоит ожидать более выраженного перекрестного взаимодействия антител с антигенами ВПЧ31 L1 и умеренного с ВПЧ18 L1 и ВПЧ45 L1. Напротив, при иммунизации ВПЧ18 L1 возможно активное перекрестное взаимодействие антител с антигенами ВПЧ45 L1 и менее выраженное с ВПЧ16 L1 и ВПЧ31 L1.

**Ключевые слова:** антигенные детерминанты, В-клетки, ВПЧ16 L1, ВПЧ18 L1, ВПЧ31 L1, ВПЧ45 L1.

## BIOINFORMATICS ANALYSIS OF PUTATIVE CAUSES FOR CROSS-REACTIVE ANTIBODIES INTERACTING WITH ANTIGENS DERIVED FROM VARIOUS PATHOGENIC HUMAN PAPILLOMAVIRUSES

Stolbikov A.S.<sup>a,b</sup>, Salyaev R.K.<sup>a</sup>, Rekoslavskaya N.I.<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation

<sup>c</sup> Irkutsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russian Federation

**Abstract.** Human papillomaviruses (HPVs) belong to highly abundant resulting in sexually transmitted virus infections, and cause cervical cancer holding place 4 among most common cancer types in women. In 2012, there were registered 266,000 death cases and 528,000 new cases. At present, three HPV prophylactic vaccines were generated worldwide: bivalent Cervarix, quadrivalent Gardasil and nonavalent Gardasil-9. Examining such vaccines uncovered that they are able to induce anti-HPV antibody production against viral antigens lacked in vaccine formula. The mechanism of such cross-neutralizing antibodies recognizing antigens derived from various HPV pathogenic types remains unknown. In our study we attempted to uncover putative basis underlying cross-reactive interaction between vaccine-induced antibodies and non-vaccine antigens by bioinformatical approaches, that might allow optimize generation of future candidate vaccines and obtain more effective polyvalent immunobiological preparations against HPV. We used amino acid sequences of L1 coat protein of four top high-risk oncogenic HPV types (16, 18, 31 and 45) in the study. Work sequences were retrieved from the International Data Base of NCBI (National Center for Biotechnology Information) and aligned by using Clustal Omega' and BioEdit software. A search and analysis of distinct antigenic determinant (epitopes) were performed by using software suite BepiPred-2.0: Sequential B-Cell Epitope Predictor, DiscoTope 2.0 Server, and SYFPEITHI. Bioinformatics data revealed pronounced potential of cross-neutralizing vaccine-induced antibodies and non-vaccines antigens derived from high-risk pathogenic types HPV 16, 18, 31 and 45 owing to the similarity in antigenic determinants (epitopes). Common linear determinants for T- and B-cells were found in all four types of L1 protein counterparts. In addition, similar three-dimensional B-cell determinants were discovered in HPV16 L1 and HPV18 L1. Antigenic determinants derived from HPV16 L1 and HPV31 L1 exhibited most close similarity. Hence, while immunizing with HPV16 L1, a more pronounced and moderate cross-reactive antibodies interacting with HPV31 L1 as well as HPV18 L1 and HPV45 L1 antigens, respectively, should be expected. Inversely, immunization with HPV18 L1 might elicit active and less efficient cross-neutralizing response with HPV45 L1 as well as HPV16 L1 and HPV31 L1, respectively.

**Key words:** antigenic determinants, B-cell, HPV16 L1, HPV18 L1, HPV31 L1, HPV45 L1.

## Введение

Вирус папилломы человека (ВПЧ) относится к группе чрезвычайно распространенных вирусных инфекций, передающихся преимущественно половым путем. По последним данным, во многих индустриально развитых странах распространенность ВПЧ-инфекции у молодых женщин составляет 40–80%, а вероятность персистенции ВПЧ-инфекции — 80–90% [1, 5]. При этом, по прогнозам специалистов, к возрасту 50 лет почти у 80% женщин будет выявлен тот или иной тип ВПЧ [12, 14]. На сегодняшний день в медицине известно более 200 видов ВПЧ. Из них более 40 видов могут вызвать поражение аногенитального тракта (половые органы и перианальная область) и по-

явление остроконечных кондилом у мужчин и женщин. Вирус папилломы человека вызывает рак шейки матки, который является четвертой по распространенности формой рака у женщин. В 2012 г. было зафиксировано 266 тыс. смертей и 528 тыс. новых случаев. Большая часть (около 85%) ВПЧ-инфекции сосредоточена в менее развитых регионах, где на их долю приходится почти 12% всех раковых заболеваний у женщин (ВОЗ, 2012).

Хотя в большинстве случаев инфицирование ВПЧ не возникает никаких симптомов, хроническая генитальная ВПЧ-инфекция может вызвать рак шейки матки. ВПЧ может также вызвать другие виды рака аногенитальной области, головы и шеи, а также остроконечные кондиломы у мужчин и женщин.

На сегодняшний день в мире созданы и успешно применяются 3 профилактические вакцины против ВПЧ — двухвалентная («Церварикс», типы вирусов 16 и 18), четырехвалентная («Гардасил», типы вирусов 16, 18, 6 и 11) и девятивалентная («Гардасил-9», типы вирусов 16, 18, 31, 33, 45, 52, 6 и 11). В большинстве стран, где эти вакцины одобрены для применения, первичной целевой группой для иммунизации против ВПЧ являются девочки-подростки в возрасте от 9 до 14 лет. Данные клинических испытаний и первичного послерегистрационного эпиднадзора, проведенных на нескольких континентах, свидетельствуют о безопасности этих вакцин. Считается, что эти профилактические вакцины обеспечивают защиту на 70% («Гардасил») и на 90% («Гардасил-9») от ВПЧ высокого риска онкогенности, а также от аногенитальных папилломатозов.

В процессе исследования этих вакцин выяснилось, что они способны индуцировать синтез антител к типам ВПЧ, антигенные белки которых не содержатся в составе вакцинного препарата [4, 6, 10, 20, 22]. В нашей работе, посвященной разработке четырехвалентной пероральной вакцины против цервикального рака на базе трансгенных растений, мы также обнаружили, что антитела к антигенному белку ВПЧ16 L1 могут взаимодействовать с антигенами других вирусов ВПЧ, вызывающих цервикальный рак. Оказалось, что антитела к ВПЧ16 L1 успешно реагируют с антигенами ВПЧ18 L1, ВПЧ31 L1 и ВПЧ45 L1 [17]. Некоторые авторы отдельно отмечают, что на перекрестное взаимодействие антител с антигенами оказывают влияние следующие факторы: доза вводимых антигенов ВПЧ при вакцинировании; продолжительность времени, прошедшего после вакцинирования; пол и ВИЧ-статус [20, 22].

Существуют несколько предположений, которые могут объяснить возможности подобного взаимодействия антигенных белков с неродственными антителами. Прежде всего, это возможно в случае сходства антигенных детерминант у разных типов ВПЧ. Такое сходство может наблюдаться как в линейных, так и конформационных (трехмерных) эпитопах или в одном из них. Второе предположение касается полиморфного распределения эпитопов (epitope spreading). Суть его заключается в том, что в результате внутри- и межмолекулярных перестроек формируются новые вторичные эпитопы, отличающиеся от исходных первичных эпитопов, возникающих под влиянием патогена. Эти вторичные эпитопы формируют новые пептиды, распознаваемые антигенпрезентирующими Т-клетками, которые стимулируют образование новой иммунологической памяти. При этом происходит модификация

популяции Т-клеток и создаются самораспознаваемые Т-клеточные мишени для деградации тканей [6, 11, 15, 20]. Третьей причиной перекрестного взаимодействия может выступать процесс индукции синтеза антител *de novo*, который происходит при участии пептидов главного комплекса гистосовместимости [11].

Анализ литературных данных показал, что зарубежные исследователи активно интересуются этим направлением работ. Ведутся исследования по увеличению спектра действия профилактических вакцин против ВПЧ. Однако, по мнению ряда ученых, классический подход, заключающийся во включении в вакцинный препарат большего количества антигенных белков, относящихся к различным типам ВПЧ, практически исчерпал себя. Так, девятивалентная вакцина «Гардасил-9» уже содержит максимально допустимое количество антигенных белков (270 мкг белка в одной дозе), при этом она не обеспечивает защиту примерно в 10% случаев. К тому же увеличение разнообразия антигенных белков в вакцинном материале связано с повышением сложности производства и увеличением затрат при изготовлении подобных вакцин. Поэтому зарубежные исследователи, используя различные методы биоинформатического анализа, активно изучают перекрестное взаимодействие антител с антигенами, принадлежащими к разным патогенным типам ВПЧ. На основе полученных данных они предпринимают попытки по созданию вакцин на основе химерных антигенных белков, содержащих общие для нескольких типов ВПЧ антигенные детерминанты [11].

Нас заинтересовали факты перекрестного взаимодействия антител с антигенами, принадлежащими к разным патогенным типам ВПЧ, и мы решили провести работу по определению причины данного явления с использованием биоинформационных методов и ресурсов. По нашему мнению, более вероятное объяснение перекрестного взаимодействия между антителами к одним типам вирусов и антигенами других лежит в области того или иного сходства антигенных детерминант. Поэтому задачей исследования стало проведение анализа имеющихся литературных данных, а также массивов биологической информации по аминокислотным последовательностям основного антигенного белка L1 различных типов ВПЧ, хранящихся в общедоступных научных базах.

Получение данных о сходстве антигенных детерминант различных типов ВПЧ может способствовать оптимизации процесса создания новых перспективных вакцинных препаратов против максимального количества высокоонкогенных типов папилломавирусов.

## Материалы и методы

**Выравнивание антигенных детерминант разных типов ВПЧ.** Для сравнения антигенных детерминант разных типов ВПЧ мы использовали полноразмерные аминокислотные последовательности, полученные в формате FASTA из базы данных NCBI (GenBank). Образцы ВПЧ (16, 18, 31, 45) из банка данных были выбраны не случайно: именно их нуклеотидные последовательности, кодирующие белок L1, использовались нами в генетических конструкциях для получения пероральной вакцины против цервикального рака, создаваемой с помощью растительной экспрессирующей системы на основе трансгенных плодов томата [17, 18, 19]. Испытание данной вакцины на мышах выявило перекрестное взаимодействие антител с антигенами, принадлежащими к разным патогенным типам ВПЧ [17]. Из базы NCBI также извлекались все имеющиеся там варианты полноразмерных белковых сиквенсов L1 по каждому из 4 типов ВПЧ. Это было необходимо для проведения множественного выравнивания всех известных изолятов ВПЧ каждого типа и последующего определения различия антигенных детерминант в пределах одного типа.

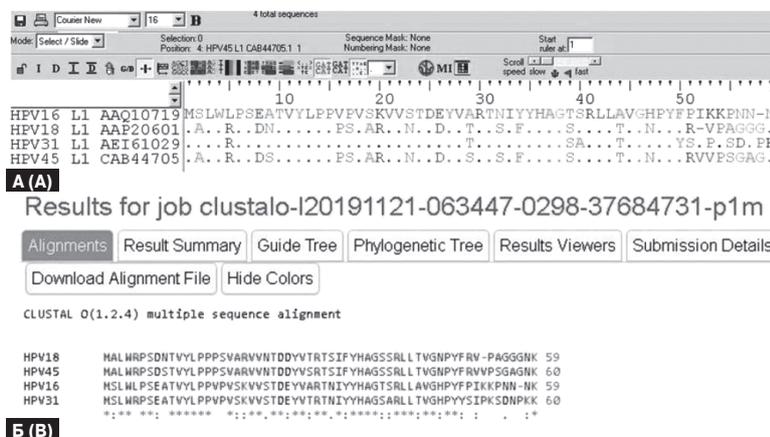
Выравнивание аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы «Clustal Omega», находящейся на сервере Европейской молекулярно-биологической лаборатории — EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>), а также редактора множественного выравнивания нуклеотидных и аминокислотных последовательностей «BioEdit». Филогенетические деревья строили с помощью программы «Simple Phylogeny» (EMBL-EBI) методом «ближайшего соседа» (neighbour-joining).

**Анализ потенциальных антигенных детерминант.** Потенциальные линейные антигенные детерминанты для В-клеток искали с помощью программы «BepiPred-2.0: Sequential B-Cell Epitope Predictor», находящейся на сервере <http://www.cbs.dtu.dk/services> (Датский технический университет DTU Bioinformatics). Потенциальные трехмерные антигенные детерминанты для В-клеток искали с помощью программы «DiscoTope 2.0 Server» (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DiscoTope>, Датский технический университет DTU Bioinformatics). Анализ проводили с максимально строгими для программы условиями: чувствительность 47%, специфичность 75%. Трехмерную модель белка HPV L1, которую мы использовали для выявления антигенных детерминант, извлекали из международной базы данных трехмерных структур белков Protein Data Bank (PDB). Для определения потенциальных антигенных детерминант для Т-клеток мы использовали программу «SYFPEITHI», располагающуюся на сервере <http://www.syfpeithi.de/bin/MHCServer.dll/EpitopePrediction.htm> (BMI (Biomedical Informatics)-Heidelberg).

## Результаты

### Выравнивание антигенных детерминант

Аминокислотные последовательности белка L1 оболочки вирусов ВПЧ 4 типов — 16 (NCBI AAQ10719.1), 18 (NCBI AAP20601.1), 31 (NCBI AEI61029.1), 45 (NCBI CAB44705.1 L1), были извлечены из международной базы данных NCBI и выравнены в программе «Clustal Omega» и в редакторе «BioEdit» (рис. 1). Так как антигенные детерминанты белка L1 в научной литературе предсказываются чаще всего для ВПЧ16



**Рисунок 1. Выравнивание аминокислотных последовательностей L1 белка 4 типов ВПЧ**

Figure 1. The alignment of amino acid sequences L1 protein of 4 types HPV

А) Редактор «BioEdit». Б) Программа «Clustal Omega».

A) Editor “BioEdit”. B) Program “Clustal Omega”.

## Phylogram

Branch length:  Cladogram  Real

## Phylogenetic Tree

**Рисунок 2. Филогенетическое древо, построенное с помощью программы «Simple Phylogeny» (EMBL-EBI) методом ближайшего соседа (neighbour-joining)**

Figure 2. The phylogenetic tree was constructed using the program “Simple Phylogeny” (EMBL-EBI) by the nearest neighbor (neighbor-joining) method

(в нашей работе перекрестное взаимодействие антигенов наблюдалось именно с антителами на HPV16 L1), то выравнивание и обрезку аминокислотной последовательности мы проводили относительно ВПЧ16 [8, 9, 13, 21].

По результатам выравнивания было построено филогенетическое древо (рис. 2), которое показывает высокое сродство последовательностей разных типов вируса, в особенности между 16 и 31 типами. Несколько отличаются от них 45 и 16 тип, которые эволюционно более близки между собой. Мы предположили, что так как 4 типа вирусов филогенетически близки, то их антигенные детерминанты располагаются примерно в одних и тех же участках линейной аминокислотной последовательности, и их молекулы формируют схожие трехмерные структуры.

### Анализ потенциальных трехмерных антигенных детерминант для В-клеток

Поиск потенциальных трехмерных антигенных детерминант для В-клеток мы начали с изучения базы данных PDB на предмет подходящих трехмерных моделей белка HPV16 L1 «DiscoTope 2.0 Server». Из 11 доступных трехмерных моделей выбрали одну (1DZL, DOI: 10.2210/pdb1DZL/pdb; <https://www.rcsb.org/structure/1dzl>), которая наиболее удовлетворяла нашим условиям и параметрам программы «DiscoTope 2.0 Server» [7]. Программа указала на существование группы потенциальных антигенных детерминант, способных взаимодействовать с В-клетками иммунной системы. Одна из аминокислотных последовательностей, указанная программой (405–443), практически полностью совпала с описанной в литературе наиболее вероятной антигенной детерминантой в третичной структуре HPV16 L1 (402–446) [13]. Так как в научном источнике указывалось, что на данном участке белковой молекулы, в позициях 420–429, должны быть аминокислоты, обладающие наиболее

A	54	LYS	4	1.415	0.792	<=B
A	55	PRO	0	2.587	2.290	<=B
A	56	ASN	0	4.447	3.936	<=B
A	57	ASN	8	4.017	2.635	<=B
A	58	ASN	0	4.187	3.706	<=B
A	59	LYS	1	3.644	3.110	<=B
A	60	ILE	10	-0.911	-1.956	<=B
A	61	LEU	7	-1.942	-2.524	<=B
A	272	PRO	2	-2.472	-2.418	<=B
A	273	ASP	4	-2.828	-2.962	<=B
A	274	ASP	1	-0.880	-0.894	<=B
A	275	LEU	6	-3.114	-3.446	<=B
A	276	TYR	13	-3.732	-4.798	<=B
A	277	ILE	4	-3.251	-3.337	<=B
A	278	LYS	3	-3.462	-3.409	<=B
A	301	THR	7	-0.567	-1.307	<=B
A	302	SER	1	-1.418	-1.370	<=B
A	303	ASP	1	-2.092	-1.966	<=B
A	350	THR	0	-4.082	-3.613	<=B
A	351	SER	5	-2.752	-3.011	<=B
A	352	GLU	10	-2.227	-3.121	<=B
A	353	THR	0	-2.126	-1.881	<=B
A	354	THR	2	-1.995	-1.995	<=B
A	355	TYR	3	-2.902	-2.914	<=B
A	405	GLY	17	-1.880	-3.619	<=B
A	406	LEU	15	-1.372	-2.940	<=B
A	407	GLN	10	-0.821	-1.877	<=B
A	408	PRO	6	-0.792	-1.391	<=B
A	409	PRO	13	-0.712	-2.125	<=B
A	410	PRO	2	0.100	-0.142	<=B
A	411	GLY	0	0.360	0.318	<=B
A	412	GLY	12	-0.140	-1.504	<=B
A	413	THR	3	-0.415	-0.712	<=B
A	414	LEU	0	-1.799	-1.592	<=B
A	415	GLU	1	-1.927	-1.820	<=B
A	416	ASP	8	-1.657	-2.387	<=B
A	417	THR	5	-1.156	-1.598	<=B
A	418	TYR	4	-2.326	-2.519	<=B
A	419	ARG	8	-1.907	-2.608	<=B
A	420	PHE	15	-1.768	-3.290	<=B
A	421	VAL	8	-1.850	-2.558	<=B
A	422	THR	6	-2.316	-2.739	<=B
A	423	SER	13	-2.481	-3.691	<=B
A	424	GLN	13	-1.136	-2.500	<=B
A	425	ALA	7	-2.403	-2.932	<=B
A	426	ILE	5	-2.345	-2.651	<=B
A	427	ALA	13	-0.637	-2.059	<=B
A	428	CYS	7	-1.160	-1.831	<=B
A	429	GLN	9	-1.661	-2.505	<=B
A	430	LYS	0	-0.446	-0.395	<=B
A	431	HIS	9	0.340	-0.735	<=B
A	432	THR	1	1.411	1.134	<=B
A	433	PRO	4	1.847	1.175	<=B
A	434	PRO	10	3.387	1.847	<=B
A	435	ALA	2	4.991	4.187	<=B
A	436	PRO	2	2.876	2.315	<=B
A	437	LYS	11	2.328	0.795	<=B
A	438	GLU	4	2.366	1.634	<=B
A	439	ASP	13	-0.087	-1.572	<=B
A	440	PRO	12	0.756	-0.711	<=B
A	441	LEU	25	-4.094	-6.498	<=B
A	442	LYS	5	0.642	-0.007	<=B
A	443	LYS	7	0.098	-0.718	<=B

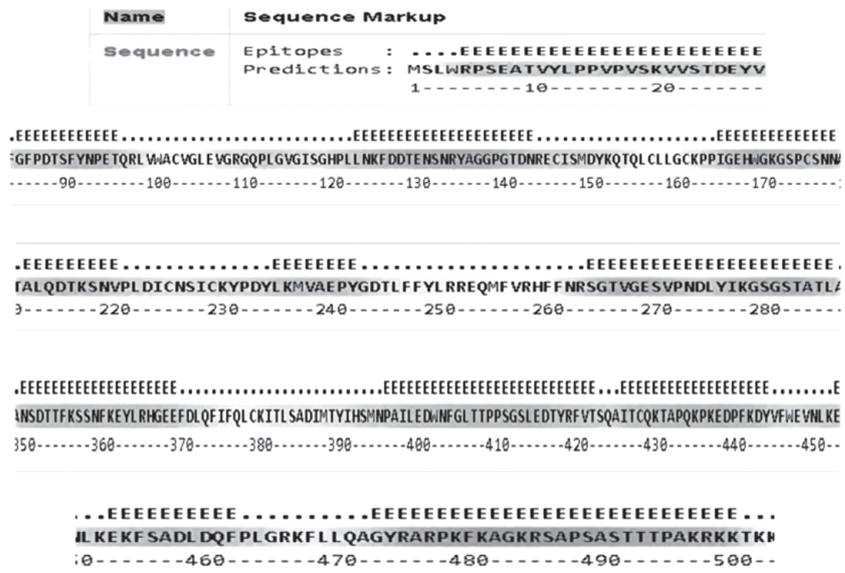
**Рисунок 3. Результат обработки трехмерной структуры белка HPV16 L1 в программе «DiscoTope 2.0 Server»**

Figure 3. The result of processing three-dimensional structure of the HPV16 L1 protein in the program “DiscoTope 2.0 Server”

**Примечание.** <=B — вероятные антигенные детерминанты.  
Note. <=B — probable antigenic determinants.

выраженными антигенными свойствами, то мы решили сравнить последовательности 4 типов ВПЧ именно в этом месте белкового сиквенса. Кроме того, программа «DiscoTope 2.0 Server» указала на следующие последовательности, которые могут выступать в качестве антигенных детерминант: 53–61, 272–278, 301–303, 350–358 (рис. 3).





**Рисунок 6. Результат обработки линейной последовательности белка HPV31 L1 в программе «BepiPred-2.0: Sequential B-Cell Epitope Predictor»**

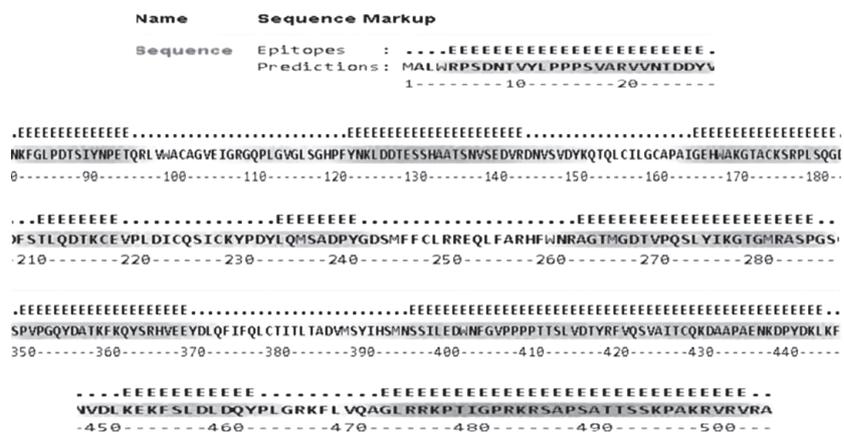
Figure 6. The result of processing linear sequence of the HPV 31 L1 protein in the program “BepiPred-2.0: Sequential B-Cell Epitope Predictor”

**Примечание.** E — вероятные антигенные детерминанты.  
Note. E — probable antigenic determinants.

детерминанты для В-клеток. Исследование проводили при показателе Epitope Threshold = 0,5 (чувствительность и специфичность имеют одинаковые значения).

Анализ линейных последовательностей HPV16 L1 выявил следующие аминокислотные антигенные детерминанты: 8–28, 83–95, 123–143, 166–177, 213–220, 234–243, 264–286, 350–369, 396–421, 426–444, 452–462, 473–502 (рис. 5). Исследование HPV31 L1 показало на-

личие следующих детерминант: 5–28, 85–96, 124–144, 166–179, 213–221, 236–243, 265–287, 351–370, 397–423, 427–445, 454–463, 474–501 (рис. 6). Обработка последовательности HPV18 L1 показала такие антигенные детерминанты: 5–27, 82–95, 123–144, 166–183, 212–219, 235–242, 264–286, 351–370, 397–445, 453–463, 474–503 (рис. 7). Исследование последовательности белка HPV45 L1 показало возможные антигенные детерминанты 5–28, 84–96, 124–144, 167–182,



**Рисунок 7. Результат обработки линейной последовательности белка HPV18 L1 в программе «BepiPred-2.0: Sequential B-Cell Epitope Predictor»**

Figure 7. The result of processing linear sequence of the HPV 18 L1 protein in the program “BepiPred-2.0: Sequential B-Cell Epitope Predictor”

**Примечание.** E — вероятные антигенные детерминанты.  
Note. E — probable antigenic determinants.



**Рисунок 8. Результат обработки линейной последовательности белка HPV45 L1 в программе «BepiPred-2.0: Sequential B-Cell Epitope Predictor»**

Figure 8. The result of processing linear sequence of the HPV45 L1 protein in the program “BepiPred-2.0: Sequential B-Cell Epitope Predictor”

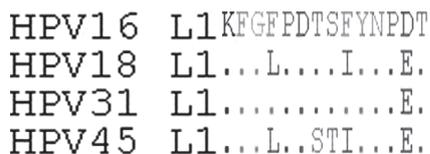
**Примечание.** E — вероятные антигенные детерминанты.  
 Note. E — probable antigenic determinants.

196–201, 213–220, 234–243, 264–289, 302–311, 353–373, 402–448, 456–466, 477–507 (рис. 8).

Из результатов анализа программой «BepiPred-2.0: Sequential B-Cell Epitope Predictor» видно, что у всех 4 типов ВПЧ белки L1 имеют примерно одинаковое расположение и количественный состав линейных антигенных детерминант для В-клеток, отличие наблюдается только в виде небольших сдвигов в несколько аминокислот. Однако стоит отметить, что у белков HPV45 L1 и HPV18 L1 присутствует относительно протяженная антигенная детерминанта в позициях аминокислотного сиквенса 402–448 и 397–445 соответственно, которая в двух других белках отсутствует. Вместо этой детерминанты в данном участке аминокислотной последовательности наблюдается наличие 2 сравнительно коротких эпитопов у HPV16 L1 (396–421, 426–444) и у HPV31 L1(397–423, 427–445) (рис. 5–8). Это можно объяснить тем, что типы ВПЧ 45 и 18 близки филогенетически (рис. 2) и относятся

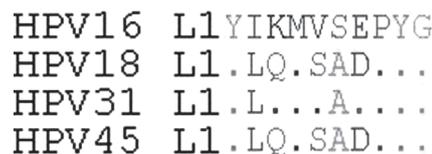
к одному виду *Alphapapillomavirus 7*, а 16 и 31 типы относятся к другому виду *Alphapapillomavirus 9*. Также у HPV45 L1 предсказаны 2 антигенные детерминанты в положениях 196–201 и 302–311, которых нет у трех других типов ВПЧ.

Для того чтобы сделать вывод о наличии сходных линейных антигенных детерминант у всех 4 рассматриваемых типов ВПЧ, необходимо было сравнить аминокислотный состав предполагаемых эпитопов. Известно, что антитела связываются с антигенами за счет водородных связей, электростатического и диполь-дипольного взаимодействий [2]. Множественные аминокислотные замены, особенно сопровождающиеся сменой аминокислот, которые резко отличаются по физико-химическим параметрам, приводят к изменению свойств аминокислот в рассматриваемом положении последовательности. Например, происходит замена полярной гидрофильной аминокислоты на неполярную гидрофобную или замена аминокислоты на другую полярную гидрофильную или неполярную гидрофобную.



**Рисунок 9. Результат аминокислотного выравнивания предполагаемой антигенной детерминанты 82–96**

Figure 9. The result of amino acid alignment of presumed antigenic determinant 82–96



**Рисунок 10. Результат аминокислотного выравнивания предполагаемой антигенной детерминанты 234–243**

Figure 10. The result of amino acid alignment of presumed antigenic determinant 234–243

кислоты, способной образовывать водородную связь, на аминокислоту, не способную ее образовывать. Это может приводить к уменьшению степени сродства с антигенами. Отсутствие замен в аминокислотных последовательностях или замены близкими по свойствам аминокислотами может сохранять уровень аффинности антител. Поэтому важно определить наличие и качество аминокислотных замен в предполагаемых антигенных детерминантах белка L1 у разных типов ВПЧ. Для анализа аминокислотных замен в предполагаемых линейных антигенных детерминантах мы провели множественное выравнивание последовательностей белков L1 ВПЧ (16, 18, 31, 45) (рис. 1). Из исследования мы исключили антигенные детерминанты, которые не присутствуют у всех 4 белков, и эпитопы, в которых наблюдаются множественные аминокислотные замены, так как с большой долей вероятности эти участки будут обладать разными антигенными свойствами. В итоге нами были выбраны следующие антигенные детерминанты: 82–96, 234–243, 452–466.

В детерминанте 82–96 у 4 типов ВПЧ имеется ряд различий в аминокислотной последовательности (рис. 9). В частности, фенилаланин в HPV18 L1 и HPV45 L1 заменен на лейцин. Эти 2 аминокислоты являются неполярными и обладают достаточно близкими физико-химическими свойствами: гидрофобностью (H), полярностью (P), средним значением площади доступной растворителю в структурах белков (SA), изоэлектрической точкой (pI), Ван-дер-Ваальсовыми радиусами (Vw) и др. У белка HPV45 L1 имеются замены треонина на серин и серина на треонин. Это очень близкие по свойствам полярные оксимоноаминокарбоновые кислоты, поэтому маловероятно, что их взаимная замена может сказаться на антигенных свойствах белка. В последовательностях HPV18 L1 и HPV45 L1 детерминанты 82–96 обнаружена замена фенилаланина на изолейцин. Обе аминокислоты полярны и имеют сходные физико-химические свойства. У белков HPV18 L1, HPV45 L1 и HPV31 L1 относительно белка HPV16 L1 имеется замена аспарагиновой кислоты на глутаминовую. Это полярные, заряженные отрицательно аминокислоты с практически одинаковыми физико-химическими свойствами. В целом можно заключить, что детерминанты 82–96 у HPV16 L1 и HPV31 L1 белков имеют практически одинаковый аминокислотный состав, а значит, обладают практически одинаковыми антигенными свойствами. Белки HPV18 L1 и HPV45 L1 имеют некоторое отличие от HPV16 L1 в аминокислотном составе в детерминанте 82–96, но оно незначительное, поэтому с большей вероятностью можно предполагать у этих белков сходные антигенные свойства этого региона.

```

HPV16 L1KEKFSADLDQF
HPV18 L1.....L....Y
HPV31 L1.....
HPV45 L1.....S....Y

```

**Рисунок 11. Результат аминокислотного выравнивания предполагаемой антигенной детерминанты 452–466**

Figure 11. The result of amino acid alignment of presumed antigenic determinant 452–466

Антигенная детерминанта, располагающаяся в регионе 234–243, у разных белков L1 также имеет некоторые аминокислотные замены (рис. 10). У белков HPV18 L1, HPV45 L1 и HPV31 L1 относительно белка HPV16 L1 имеется замена изолейцина на лейцин. Данные аминокислоты относятся к одному классу (алифатические неполярные) и имеют практически одинаковые физико-химические свойства, поэтому такая замена не должна влиять на антигенные свойства детерминанты. В белках HPV18 L1 и HPV45 L1, в отличие от белков HPV16 L1, лизин заменен на глутамин. Эти аминокислоты являются полярными, но имеют разный заряд (лизин заряжен положительно при pH = 7, а глутамин — нейтрально), есть небольшое различие в pI и Vw, что может незначительно повлиять на антигенные свойства. Следующая аминокислотная замена у HPV18 L1 и HPV45 L1 относительно HPV16 L1 является критической, так как неполярный валин заменен на полярный незаряженный серин. Это разные по свойствам аминокислоты. Далее из результатов выравнивания обнаруживается замена у HPV18 L1, HPV45 L1 и HPV31 L1 относительно белка HPV16 L1 полярного незаряженного серина на неполярный аланин. Последняя замена в этом регионе аминокислотной последовательности — это замена глутаминовой кислоты у HPV18 L1, HPV45 L1 на аспарагиновую. Это полярные, заряженные отрицательно аминокислоты с практически одинаковыми физико-химическими свойствами. По результатам сравнения аминокислотных последовательностей антигенной детерминанты 234–243 можно полагать, что у HPV16 L1 и HPV31 L1 имеется сходство в антигенных свойствах в этом участке. У белков HPV18 L1 и HPV45 L1 данная антигенная детерминанта будет иметь некоторое различие в антигенных свойствах относительно HPV16 L1.

Исследование детерминанты 452–466 выявило незначительные аминокислотные замены (рис. 11). Так, у HPV18 L1 наблюдается замена относительно белка HPV16 L1 неполярной аминокислоты аланина на неполярный лейцин. Это аминокислоты одного класса, имеющие

Тип HPV HPV type	Position Позиция	Score	Аминокислотная последовательность Amino acid sequence
HPV16	12	22	YLPPVPVSKV
	304	22	AQIFNKPYWL
	372	22	LQFIFQLCKI
HPV18	181	24	SQGDCPPLEL
	12	22	YLPPPSVARV
	304	21	SQLFNKPYWL
HPV31	12	22	YLPPVPVSKV
	69	22	LQYRVFRVRL
	373	22	LQFIFQLCKI
HPV45	12	22	YLPPPSVARV
	307	21	SQLFNKPYWL
	464	21	DQYPLGRKFL

**Таблица. Вероятные антигенные детерминанты для Т-клеток (HLA-B13 decamers) в белковых последовательностях HPV16 L1, HPV18 L1, HPV31 L1, HPV45 L1 согласно программе «SYFPEITHI»**

Table. Probable antigenic determinants for T-cells (HLA-B13 decamers) in the protein sequences HPV16 L1, HPV 18 L1, HPV31 L1, HPV45 L1 according to the program "SYFPEITHI"

сходство по физико-химическим характеристикам, поэтому влияние на антигенные свойства данная замена практически не оказывает. В том же месте наблюдается замена у HPV45 L1 относительно HPV16 L1 неполярной аминокислоты аланина на полярный серин. Эта замена теоретически может повлиять на антигенные свойства, так как аминокислоты обладают разными физико-химическими характеристиками. Последняя аминокислотная замена в данном регионе белка L1 наблюдается у HPV18 L1 и HPV45 L1 относительно белка HPV16 L1. Это замена ароматической аминокислоты фенилаланина на ароматическую кислоту тирозин. Данные аминокислоты обладают сходными физико-химическими свойствами, поэтому не должны влиять на антигенные свойства детерминанты. В итоге можно сказать, что детер-

```

HPV16 L1YLPPVPVSKV
HPV18 L1....PS.AR.
HPV31 L1.....
HPV45 L1....PS.AR.
    
```

**Рисунок 12. Результат аминокислотного выравнивания предполагаемой антигенной детерминанты 12–21**

Figure 12. The result of amino acid alignment of presumed antigenic determinant 12–21

минанта 452–466 является наиболее сходной у всех четырех белков L1, в особенности это касается HPV16 L1 и HPV31 L1, здесь можно предполагать абсолютное сходство антигенных свойств. Белок HPV45 L1 хоть и имеет критическую замену аминокислоты, но, так как подобное замещение единично, оно, скорее всего, не отразится на антигенных свойствах детерминанты 452–466.

Мы сочли целесообразным получить дополнительные доказательства влияния сходства антигенных детерминант вирусных белков HPV16 L1, HPV18 L1, HPV31 L1, HPV45 L1 на перекрестное взаимодействие антител с антигенами, принадлежащими к разным патогенным типам вируса папилломы человека. Для этого был осуществлен поиск потенциальных антигенных детерминант для Т-клеток с помощью программы «SYFPEITHI». Данная программа ранжирует возможные варианты антигенных детерминант согласно вероятности их взаимодействия с Т-клетками. Используемые алгоритмы расчета взяты из книги «MHC Ligands and Peptide Motifs» (H.G. Rammensee, J. Bachmann, S. Stevanovic).

Результаты обработки белковых последовательностей 4 белков L1 показали, что наиболее вероятной антигенной детерминантой для Т-клеток будет детерминанта, находящаяся в позиции 12–21. Хотя у HPV18 L1 программа показала, что эта детерминанта находится на второй позиции, но несмотря на это имеет достаточно высокий балл (Score) вероятности (табл.).

Для того чтобы удостовериться, что данная детерминанта обладает сходными антигенными свойствами у всех 4 белков L1, мы провели сравнения ее аминокислотных последовательностей (рис. 12). По результатам выравнивания видно, что HPV18 L1 и HPV45 L1 имеют 4 замены относительно HPV16 L1 и HPV31 L1. Две из них — это замены на близкие по свойствам аминокислоты: валин на пролин и лизин на аргинин. Две другие являются заменами на отличающиеся по физико-химическими свойствам аминокислоты: пролин на серин и серин на аланин. В целом надо отметить, что данная антигенная детерминанта у белков HPV16 L1 и HPV31 L1 должна обладать близкими антигенными свойствами. Белки HPV18 L1 и HPV45 L1 по данной антигенной детерминанте должны обладать сходными антигенными свойствами и несколько отличаться по этому показателю от HPV16 L1 и HPV31 L1.

## Обсуждение

Результаты биоинформационного исследования выявили значительный потенциал перекрестного взаимодействия антител с антигена-

ми, принадлежащими к патогенным типам ВПЧ 16, 18, 31, 45 за счет сходства антигенных детерминант. Были обнаружены общие линейные детерминанты для Т-клеток и В-клеток у всех 4 типов вирусных белков L1. Также обнаружены сходные трехмерные антигенные детерминанты для В-клеток у HPV16 L1 и HPV18 L1. К сожалению, сравнить трехмерные антигенные детерминанты для HPV31 L1 и HPV45 L1 не удалось по причине отсутствия трехмерных моделей этих белков в базах данных. Однако учитывая сходства их аминокислотных последовательностей и линейных детерминант с белками HPV16 L1 и HPV18 L1, можно предположить похожую пространственную структуру и, следовательно, сходное расположение антигенных детерминант. Стоит отметить, что антигенные детерминанты HPV16 L1 и HPV31 L1 более близки друг другу. Подобное сходство наблюдается между HPV18 L1 и HPV45 L1. Поэтому при иммунизации HPV16 L1 стоит ожидать более выраженного перекрестного взаимодействия антител с антигенами HPV31 L1 и умеренного с HPV18 L1 и HPV45 L1. Напротив, при иммунизации HPV18 L1 возможно активное перекрестное взаимодействие антител с антигенами HPV45 L1 и менее выраженное с HPV16 L1 и HPV31 L1.

Полученные результаты соотносятся с данными зарубежных коллег, которые, используя схожие биоинформатические методы, исследовали перекрестное взаимодействие антител с антигенами, принадлежащими к разным

патогенным типам вируса папилломы человека. На основе этих данных они создавали кандидатные мультиэпитопные вакцины, которые испытывали на лабораторных мышах. Исследования данных препаратов *in vivo* показали, что даже без использования адъюванта рекомбинатные вакцины индуцировали эффективные иммунные ответы и защищали мышей от опухолевых клеток (процент мышей без опухоли ~66,67) [16].

Используемые в работе методы можно применять для анализа сродства антигенных детерминант у широкого круга патогенных типов ВПЧ. Это позволит за относительно короткий срок выявить возможные варианты перекрестного взаимодействия антител с антигенами, принадлежащими к разным патогенным типам ВПЧ, что значительно сократит время и средства на практические лабораторные исследования. Полученные данные можно использовать для оптимизации производства вакцин против различных патогенных типов вируса папилломы человека, в частности производить вакцины на основе химерных антигенных белков, которые содержат общие антигенные детерминанты для нескольких типов ВПЧ. Это, возможно, снизило бы стоимость производства вакцин и уменьшило бы нагрузку на организм вакцинируемого человека в силу сокращения количества вводимых антигенных белков и сопутствующих веществ (адъювантов), которые могут вызывать аллергические реакции.

## Список литературы/References

1. Костин А.А., Старинский В.В., Самсонов Ю.В., Асратов А.Т. Анализ статистических данных о злокачественных новообразованиях, ассоциированных с вирусом папилломы человека // Исследования и практика в медицине. 2016. Т. 3, № 1. С. 66–78. [Kostin A.A., Starinskiy V.V., Samsonov Y.V., Asratov A.T. The analysis of statistical data on malignant neoplasms associated with human papillomavirus. *Issledovaniya i praktika v meditsine = Research'n Practical Medicine Journal*, 2016, vol. 3. no. 1, pp. 66–78. doi: 10.17709/2409-2231-2016-3-1-9 (In Russ.)]
2. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: учебник; в 2-х т. Т. 1. Под ред. В.В. Зверева, М.Н. Бойченко. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 448 с. [Medical microbiology, virology and immunology. Eds. Zverev V.V., Boychenko M.N. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. Vol. 1. 448 p. (In Russ.)]
3. Bishop V., Dasgupta J., Klein M., Garcea R.L., Christensen N.D., Zhao R., Chen X.S. Crystal structures of four types of human papillomavirus L1 capsid proteins: understanding the specificity of neutralizing monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.*, 2007, vol. 282, pp. 31803–31811. doi: 10.1074/jbc.M706380200
4. Bisset S.L., Draper E., Myers R.E., Godi A., Bedrows S. Cross-neutralizing antibodies elicited by the Cervarix® human papillomavirus vaccine display a range of Alpha-9 inter-type specificities. *Vaccine*, 2014, vol. 32, no. 10, pp. 1139–1146. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.01.008
5. Bosch F.X., Broker T.R., Forman D., Moscicki A.B., Gillison M.L., Doorbar J., Stern P.L., Stanley M., Arbyn M., Poljak M., Cuzick J., Castle P.E., Schiller J.T., Markowitz L.E., Fisher W.A., Canfell K., Denny L.A., Franco E.L., Steben M., Kane M.A., Schiffman M., Meijer C.J., Sankaranarayanan R., Castellsagué X., Kim J.J., Brotons M., Alemany L., Albero G., Diaz M., de Sanjosé S. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine*, 2013, vol. 31, suppl. 7: H1–H31. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.10.003
6. Brown D.R., Kjaer S.K., Sigurdsson K., Iversen O.-E., Hernandez-Avila M., Wheeler C.M., Perez G., Koutsky L.A., Tay E.H., Garcia P., Ault K.A., Garland S.M., Leodolter S., Olsson S.E., Tang G.W., Ferris D.G., Paavonen J., Steben M., Bosch F.X., Dillner J., Joura E.A., Kurman R.J., Majewski S., Muñoz N., Myers E.R., Villa L.L., Taddeo F.J., Roberts C., Tadesse A., Bryan J., Lupinacci L.C., Giacoletti K.E., Sings H.L., James M., Hesley T.M., Barr E. The impact of quadrivalent human papillomavirus (HPV; types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine on infection and disease due to oncogenic nonvaccine HPV types in generally HPV-naïve women aged 16–26 years. *J. Infect. Dis.*, 2009, vol. 199, no. 7, pp. 926–935. doi: 10.1086/597307

7. Chen X.S., Garcea R.L., Goldberg I., Casini G., Harrison S.C. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol. Cell.*, 2000, vol. 5 (3), pp. 557–567. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80449-9
8. Christensen N.D., Dillner J., Eklund C., Carter J.J., Wipf G.C., Reed C.A., Cladel N.M., Galloway D.A. Surface conformational and linear epitopes on HPV-16 and HPV-18 L1 virus-like particles as defined by monoclonal antibodies. *Virology*, 1996, vol. 223, pp. 174–184. doi: 10.1006/viro.1996.0466
9. Combita A.L., Touzé A., Bousarghin L., Christensen N.D., Coursaget P. Identification of two cross-neutralizing linear epitopes within the L1 major capsid protein of Human Papillomaviruses. *J. Virol.*, 2002, vol. 76 (13), pp. 6480–6486. doi: 10.1128/jvi.76.13.6480-6486.2002
10. Kemp T.J., Hildesheim A., Safaeian M., Dauner J.G., Pan Y., Porras C., Schiller J.T., Lowy D.R., Herrero R., Pinto L.A. HPV16/18 L1 VLP Vaccine Induces Cross-Neutralizing Antibodies that May Mediate Cross-Protection. *Vaccine*, 2011, vol. 29 (11), pp. 2011–2014. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.01.001
11. Li Z., Song S., He M., Wang D., Shi J., Liu X., Li Y., Chi X., Wei S., Yang Y., Wang Z., Li J., Qian H., Yu H., Zheng Q., Yan X., Zhao Q., Zhang J., Gu Y., Li S., Xia N. Rational design of a triple-type human papillomavirus vaccine by compromising viral-type specificity. *Nat. Commun.*, 2018, vol. 9: 5360. doi: 10.1038/s41467-018-07199-6
12. McLaughlin-Drubin M.E., Münger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Res.*, 2009, vol. 143 (2), pp. 195–208. doi: 10.1016/j.virusres.2009.06.008
13. Modis Y., Trus B.L., Harrison S.C. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J.*, 2002, vol. 21, no. 18, pp. 4754–4762. doi: 10.1093/emboj/cdf494
14. Myers E.R., McCrory D.C., Nanda K., Bastian L., Matchar D.B. Mathematical model for the natural history of human papillomavirus infection and cervical carcinogenesis. *Am. J. Epidemiol.*, 2000, vol. 151 (12), pp. 1158–1171. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a010166
15. Nakagawa M., Greenfield W., Moerman-Herzog A., Coleman H.M. Cross-reactivity, epitope spreading, and de novo immune stimulation are possible mechanisms of cross-protection of nonvaccine human papillomavirus (HPV) types in recipients of HPV therapeutic vaccines. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2015, vol. 22, no. 7, pp. 679–687. doi: 10.1128/CVI.00149-15
16. Namvar A., Bolhassani A., Javadi G., Noormohammadi Z. In silico/in vivo analysis of high-risk papillomavirus L1 and L2 conserved sequences for development of cross-subtype prophylactic vaccine. *Sci. Rep.*, 2019, vol. 9 (1): 15225. doi: 10.1038/s41598-019-51679-8
17. Salyaev R.K., Rekoslavskaya N.I., Stolbikov A.S. Cross-reactivity of antigens and antibodies belonging to different pathogenic types of human papillomaviruses. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2017, vol. 477, no. 3, pp. 371–375. doi: 10.1134/S1607672917060084
18. Salyaev R.K., Rekoslavskaya N.I., Stolbikov A.S., Tretyakova A.V. Using the omega leader sequence of tobacco mosaic virus to transform tomato fruits with the papillomavirus HPV16 L1 gene to enhance production of the antigenic protein HPV16 L1. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2016, vol. 468, no. 1, pp. 187–189. doi: 10.1134/S1607672916030078
19. Salyaev R.K., Rekoslavskaya N.I., Tretyakova A.V. The study of immunogenicity of the antigenic protein of high risk oncogenic type of the human papillomavirus HPV16 L1 produced in the plant expression system on the base of transgenic tomato. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2017, vol. 474, no. 1, pp. 186–188. doi: 10.1134/S1607672917030140
20. Scherpenisse M., Schepp R.M., Mollers M., Meijer C.J.L.M., Berbers G.A.M. Characteristics of HPV-specific antibody responses induced by infection and vaccination: cross-reactivity, neutralizing activity, avidity and IgG subclasses. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 9: e74797. doi: 10.1371/journal.pone.0074797
21. Shen Z.T., Nguyen T.T., Daniels K.A., Welsch R.M., Stern L.J. Disparate epitopes mediating protective heterologous immunity to unrelated viruses share pMHC structural features recognized by cross-reactive T cells. *J. Immunol.*, 2013, vol. 191, no. 10, pp. 5139–5152. doi: 10.4049/jimmunol.1300852
22. Toft L., Tolstrup M., Müller M., Sehr P., Bonde J., Storgaard M., Østergaard L., Søgaard O.S. Comparison of the immunogenicity of Cervarix® and Gardasil® human papillomavirus vaccines for oncogenic non-vaccine serotypes HPV-31, HPV-33, and HPV-45 in HIV-infected adults. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2014, vol. 10, iss. 5, pp. 1147–1154. doi: 10.4161/hv.27925

**Авторы:**

**Столбиков А.С.**, к.б.н., старший научный сотрудник Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, Россия; доцент кафедры физиологии растений, клеточной биологии и генетики Иркутского государственного университета, г. Иркутск, Россия;  
**Салаяев Р.К.**, член-корреспондент РАН, д.б.н., советник РАН, Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, Россия;  
**Рекославская Н.И.**, д.б.н., главный научный сотрудник, Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН; Иркутский научный центр Сибирского отделения Российской Академии наук, г. Иркутск, Россия.

**Authors:**

**Stolbikov A.S.**, PhD (Biology), Senior Researcher, Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russian Federation; Associate Professor, Department of Plant Physiology, Cell Biology and Genetics, Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation;  
**Salyaev R.K.**, RAS Corresponding Member, PhD, MD (Biology), Advisor for Russian Academy of Sciences, Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk, Russian Federation;  
**Rekoslavskaya N.I.**, PhD, MD (Biology), Head Researcher, Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk, Russian Federation; Irkutsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 29.08.2019  
 Отправлена на доработку 20.11.2019  
 Принята к печати 11.03.2020

Received 29.08.2019  
 Revision received 20.11.2019  
 Accepted 11.03.2020

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ТЯЖЕЛОЙ ФОРМЫ ТЕЧЕНИЯ ВЭБ-МОНОНУКЛЕОЗА

Е.Н. Филатова<sup>1</sup>, Н.А. Сахарнов<sup>1</sup>, О.В. Уткин<sup>1</sup>, Е.А. Кулова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

**Резюме.** Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) является одним из этиологических агентов инфекционного мононуклеоза. Тяжелая форма течения заболевания может приводить к развитию серьезных осложнений, риск возникновения которых зависит в том числе от состояния иммунной системы пациента. На сегодняшний день отсутствуют специфические тесты, позволяющие определять риск развития тяжелой формы болезни. Целью работы стало выявление молекулярно-генетических маркеров тяжелой формы течения ВЭБ-инфекционного мононуклеоза (ВЭБ-ИМ) в иммунокомпетентных клетках периферической крови. В лейкоцитах периферической крови пациентов с ВЭБ-ИМ тяжелой и средней степени тяжести, а также практически здоровых доноров определяли экспрессию 483 генов и транскриптов генов, регулирующих апоптоз, пролиферацию и дифференцировку иммунокомпетентных клеток. Использовали ДНК-биочипы оригинального дизайна. Обработку результатов осуществляли с применением разработанной нами программы «MiDA». Для выявления маркеров тяжелой формы течения патологии проводили сравнение экспрессии каждого гена и транскрипта у пациентов с ВЭБ-ИМ и практически здоровых доноров. Для каждого гена и транскрипта определяли уровень изменения экспрессии и значимость для бинарной классификации. В качестве маркеров тяжелой формы ВЭБ-ИМ отбирали гены и транскрипты, характеризовавшиеся максимальными значениями двух определяемых параметров при сравнении пациентов с тяжелой формой инфекции и здоровых доноров, а также пациентов с тяжелой и средней степенью тяжести ВЭБ-ИМ. Гены и транскрипты, экспрессия которых различалась у пациентов с ВЭБ-ИМ средней степени тяжести и здоровых доноров, из перечня маркеров исключались. Также были исключены маркеры, дифференциально экспрессирующиеся в зависимости от пола и возраста обследуемых. В перечень маркеров тяжелой формы течения ВЭБ-ИМ вошли регуляторы апоптоза (гены BCL2L11, BIRC3 и транскрипт XIAP.NM\_001167), а также факторы сплайсинга (ген CELF6 и транскрипт SF1.NM\_201995). По сравнению с донорами и пациентами со средней степенью тяжести заболевания, у пациентов с тяжелой формой течения ВЭБ-ИМ в крови выявлено снижение экспрессии генов BCL2L11, BIRC3, транскриптов SF1.NM\_201995 и XIAP.NM\_001167, а также усиление экспрессии гена CELF6. Функциональная роль установленных молекулярных маркеров позволяет предположить, что тяжелая форма ВЭБ-ИМ характеризуется подавлением митохондриального и активацией TRAF-зависимого путей апоптоза в иммунокомпетентных клетках пациентов. Характер экспрессии выделенных маркеров является специфич-

---

**Адрес для переписки:**

Филатова Елена Николаевна  
603950, Россия, г. Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71,  
ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии  
им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора.  
Тел.: 8 (831) 469-79-46 (служебн.). Факс: 8 (831) 469-79-20.  
E-mail: filatova@nniim.ru

**Contacts:**

Elena N. Filatova  
603950, Russian Federation, Nizhny Novgorod,  
Malaya Yamskaya str., 71, Blokhina Research Institute  
of Epidemiology and Microbiology.  
Phone: +7 (831) 469-79-46 (office). Fax: +7 (831) 469-79-20.  
E-mail: filatova@nniim.ru

**Библиографическое описание:**

Филатова Е.Н., Сахарнов Н.А., Уткин О.В., Кулова Е.А. Определение молекулярно-генетических маркеров тяжелой формы течения ВЭБ-мононуклеоза // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 4. С. 707–716. doi: 10.15789/2220-7619-DMA-1271

**Citation:**

Filatova E.N., Sakharnov N.A., Utkin O.V., Kulova E.A. Determining molecular and genetic markers for severe EBV-mononucleosis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 4, pp. 707–716. doi: 10.15789/2220-7619-DMA-1271

ческим для тяжелой формы течения ВЭБ-ИМ, не зависит от пола и возраста пациентов. Результаты работы могут быть использованы при разработке специфических средств оценки риска развития осложнений ВЭБ-мононуклеоза.

**Ключевые слова:** вирус Эпштейна–Барр, инфекционный мононуклеоз, тяжелое течение, осложнение, экспрессия генов, апоптоз, сплайсинг, ДНК-биочип.

## DETERMINING MOLECULAR AND GENETIC MARKERS FOR SEVERE EBV-MONONUCLEOSIS

Filatova E.N.<sup>a</sup>, Sakharnov N.A.<sup>a</sup>, Utkin O.V.<sup>a</sup>, Kulova E.A.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

<sup>b</sup> Privolzhsky Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation

**Abstract.** Epstein–Barr virus (EBV) is one of the etiological agents causing infectious mononucleosis. A severe form of the disease can result in developing serious complications, which risk might also depend on the state of patient's immune system. To date, no specific tests for assessing a risk of developing severe disease form are available. Our study was aimed at identifying molecular genetic markers of severe EBV-infectious mononucleosis (EBV-IM) in immunocompetent peripheral blood cells. Expression of 483 genes and gene transcripts regulating apoptosis, proliferation and differentiation of immunocompetent cells was measured in the peripheral blood leukocytes from patients with severe and moderate EBV-IM as well as apparently healthy donors. A DNA-microarray designed by us and subsequent data processing were carried out by using custom-made "MiDA" software. To identify markers of a severe form of the pathology, expression of each gene and transcript was compared in EBV-IM patients and apparently healthy donors. For each gene and transcript, the level of expression fold change and significance for binary classification were determined. Genes and transcripts, characterized by the maximum values of two determined parameters while comparing patients with severe infection and healthy donors, as well as patients with severe and moderate EBV-IM forms, were selected as markers of severe EBV-IM. Genes and transcripts with differed expression in patients with moderate EBV-IM and healthy donors, were excluded from the list of markers. In addition, sex- and age-linked markers with differed expression were excluded as well. The markers for severe EBV-IM consisted of apoptosis regulators (BCL2L11, BIRC3 genes and XIAP.NM\_001167 transcript) and splicing factors (CELF6 gene and SF1.NM\_201995 transcript). Compared with donors and patients with a moderate form of the disease, a decreased expression of BCL2L11, BIRC3 genes, transcripts SF1.NM\_201995 and XIAP.NM\_001167, as well as increased expression of the CELF6 gene were detected in the blood of patients with severe EBV-IM. The functional role of identified molecular markers suggests that severe EBV-IM is characterized by suppressed mitochondrial and activated TRAF-dependent apoptosis pathways in immunocompetent cells. The expression pattern for select markers is specific for severe EBV-IM, not associated with patient sex and age. Thus, study data may be used to develop specific tools for assessing a risk of developing complications of EBV mononucleosis.

**Key words:** Epstein–Barr virus, infectious mononucleosis, severe form, complication, gene expression, apoptosis, splicing, DNA-microarray.

## Введение

Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ, вирус герпеса 4 типа) — ДНК-содержащий лимфопролиферативный вирус из семейства *Herpesviridae*. ВЭБ обладает высокой тропностью к В- и Т-лимфоцитам, поражает клетки эпителия рото- и носоглотки, канальцев слюнных желез и тимуса. Вирус повсеместно распространен. По различным данным его носителями являются 90–99% взрослого населения, при этом первичное инфицирование чаще всего происходит в детском и подростковом возрасте. В 25–75% случаев ВЭБ-инфекция сопровождается развитием симптомокомплекса инфекционного мононуклеоза различной степени тяжести. Тяжелая форма течения ВЭБ-инфекционного мононуклеоза (ВЭБ-ИМ) может приводить к развитию хронической активной ВЭБ-инфекции и возникновению осложнений, в частности аутоиммунных и зло-

качественных лимфопролиферативных заболеваний [9, 14]. Риск развития тяжелой формы ВЭБ-ИМ зависит от многих факторов, включая индивидуальные особенности пациента: иммунный статус, генетическую предрасположенность, возраст [13, 21].

На сегодняшний день тяжесть течения ВЭБ-ИМ определяют по результатам неспецифических лабораторных тестов, степени выраженности клинических симптомов, длительности их сохранения, развитию осложнений и сопутствующих заболеваний. Молекулярные механизмы возникновения тяжелой формы ВЭБ-ИМ до конца не изучены, а специфические тесты, позволяющие превентивно оценить риск ее возникновения, отсутствуют. Известно, что тяжелое течение заболевания сопровождается развитием выраженного лимфопролиферативного синдрома, возникающего вследствие дисбаланса в системе «пролиферация–апоптоз», нарушением механизмов Т- и НК-клеточного

иммунного ответа, развитием неконтролируемых цитотоксических и воспалительных реакций [10, 21]. В связи с этим с целью поиска молекулярно-генетических маркеров риска развития тяжелой формы ВЭБ-ИМ представляется целесообразным оценивать экспрессию генов, регулирующих апоптоз, пролиферацию и дифференцировку иммунокомпетентных клеток.

Цель работы — поиск новых молекулярно-генетических маркеров тяжелой формы течения ВЭБ-инфекционного мононуклеоза.

## Материалы и методы

**Группы исследования.** В исследование вошли дети и подростки 6–17 лет с диагнозом «острый инфекционный мононуклеоз». С помощью коммерческих тест-систем в образцах сыворотки крови пациентов определяли наличие специфических антител к ВЭБ, герпесвирусу человека 6 типа и цитомегаловирусу (тест-системы «ВектоВЭБ-VCA-IgM», «ВектоВЭБ-VCA-IgG», «ВектоННВ-6-IgG», «ВектоЦМВ-IgM», «ВектоЦМВ-IgG» производства «Вектор-Бест», Россия). В образцах крови участников определяли наличие ДНК вирусов с применением коммерческого набора для ПЦР в реальном времени «АмплиСенс EBV/CMV/ННВ6-скрин-FL» (ЦНИИЭ, Россия). На основании результатов тестирования для исследования отбирали пациентов с инфекционным мононуклеозом, образцы которых содержали антитела и ДНК к ВЭБ, но не к двум другим герпесвирусам. Далее, исходя из клинических симптомов, участников разделяли на две группы: группу пациентов с острым ВЭБ-ИМ средней степени тяжести (ВЭБ-ОС, n = 9, средний возраст 13 лет) и группу пациентов с острой тяжелой формой ВЭБ-ИМ (ВЭБ-ОТ, n = 18, средний возраст 11 лет). Критериями для включения в группы стали следующие показатели: повышение уровня трансаминаз АсАт и АлАт (в 1–3 раза для ВЭБ-ОС и 3–6 раз для ВЭБ-ОТ по сравнению с донорами), содержание в крови атипичных мононуклеарных клеток (10–20% и более 20% соответственно), размер подмышечных, околоушных и заднешейных лимфатических узлов (1,5–2,5 и 2,6–6,0 см соответственно для каждой группы исследования). В качестве материала для исследования использовали образцы периферической крови, которые забирали до начала лечения и после реконвалесценции, подтвержденной отсутствием клинических и лабораторных признаков заболевания (группы ВЭБ-РС и ВЭБ-РТ). Средний срок повторного забора крови составлял 2 месяца после реконвалесценции. Для формирования группы сравнения использовали образцы периферической крови, полу-

ченные от практически здоровых доноров сопоставимого возраста и пола (группа НОРМ, n = 50, средний возраст 11 лет). Забор материала выполняли после получения информированного согласия родителей или опекунов в соответствии с Хельсинской декларацией.

**Пробоподготовка и гибридизация РНК.** Для исследования транскриптома иммунокомпетентных клеток использовали лейкоцитарную фракцию периферической крови, выделенную с применением раствора «Гемолитик» (ЦНИИЭ, Россия). Пул тотальной РНК выделяли с помощью набора «МАГНО-сорб» (ЦНИИЭ, Россия) и концентрировали смесью фенола и хлороформа в соотношении 1:1 в кислой среде. С применением набора «Mint cDNA synthesis kit» (Евроген, Россия) проводили обратную транскрипцию тотальной РНК, при этом 3'-олиго-Т-праймер заменяли на содержащий Т7 промотор-олиго-Т-праймер (ДНК-синтез, Россия). Далее производили достройку второй цепи и амплификацию кДНК. Полученную кДНК транскрибировали с использованием Т7 РНК-полимеразы (Thermo Scientific, ЕС), при этом добавляли биотинилированные УТФ (ДНК-синтез, Россия). Для стандартизации количества исследуемого материала на этапах обратной транскрипции РНК и транскрипции кДНК использовали по 2 мкг матрицы.

Полученную меченую РНК в количестве 2 мкг гибридизовали на ДНК-биочип собственного дизайна, выполненного на базовой платформе «CustomArray Inc.» (США), содержащий набор зондов, селекцию которых осуществляли согласно описанному ранее алгоритму [1]. Суммарно биочип включал 483 зонда, комплементарных последовательностям 147 генов (совокупности транскриптов — сплайсинговых вариантов мРНК одного гена) и 336 индивидуальных транскриптов генов, регулирующих апоптоз, пролиферацию и дифференцировку иммунокомпетентных клеток. Полный перечень детектируемых генов и транскриптов представлен в таблице 1 дополнительных материалов (доступ по ссылке <https://cloud.nniem.ru/s/KY6gDhCXFxpAKk>). Считывание сигнала гибридизации целевой РНК на соответствующий зонд биочипа производили амперометрическим способом с применением устройства и программного обеспечения «ElectraSense» (CustomArray Inc., США). Полученный сигнал рассматривали как относительный уровень экспрессии гена или транскрипта.

**Обработка данных.** Обработку полученных данных выполняли в программной среде R с применением пакета «MiDA» (размещен в официальном репозитории «The Comprehensive R Archive Network», доступ по ссылке <https://CRAN.R-project.org/package=MiDA>). На пред-

варительном этапе проводили вычитание фонового шума и квантильную нормализацию. Для разведывательной оценки данных производили факторный анализ методом главных компонент. При этом в качестве возможных группирующих переменных рассматривали состояние участников (здоровые доноры, пациенты с острой формой инфекции и реконвалесценты), тяжесть течения инфекции, пол и возраст.

Для определения маркеров тяжелой формы течения ВЭБ-ИМ сравнивали уровень экспрессии каждого гена или транскрипта между группой НОРМ и каждой экспериментальной группой попарно. Для выявления различий в уровнях экспрессии использовали Т-тест с поправкой на множественные сравнения (False Discovery Rate), при значении  $q < 0,05$  различия считали статистически значимыми. Рассчитывали кратность изменения экспрессии (Fold Change, FC) как логарифм соотношения средних значений уровня экспрессии гена или транскрипта в каждой экспериментальной группе и группе НОРМ по основанию 2:

$$FC = \log_2(\text{среднее экспериментальной группы} / \text{среднее группы НОРМ}).$$

Для групп сравнения ВЭБ-ОТ — НОРМ, ВЭБ-ОС — НОРМ и ВЭБ-ОТ — ВЭБ-ОС производили попарный дискриминантный анализ, строя классификационную модель. Использовали алгоритм градиентного бустинга над решающими деревьями с применением кросс-валидации. Модель считали эффективной при среднем значении площади под кривой ошибок (AUC) не менее 0,75. При построении эффективного классификатора рассчитывали средний показатель важности каждого гена или транскрипта для классификации (Feature Importance, FI).

Отбор генов и транскриптов производили с учетом параметров FC и FI. То есть для каждой пары групп ВЭБ-ОТ — НОРМ, ВЭБ-ОС — НОРМ и ВЭБ-ОТ — ВЭБ-ОС выделяли кандидатные дискриминирующие маркеры с максимальным значением FC и/или FI. Для определения маркеров тяжелой формы течения ВЭБ-ИМ проводили логическое исключение: отбирали гены и транскрипты, вошедшие в перечень кандидатных маркеров для групп ВЭБ-ОТ — НОРМ и ВЭБ-ОТ — ВЭБ-ОС, но не вошедшие в перечень кандидатных маркеров для групп ВЭБ-ОС — НОРМ.

## Результаты

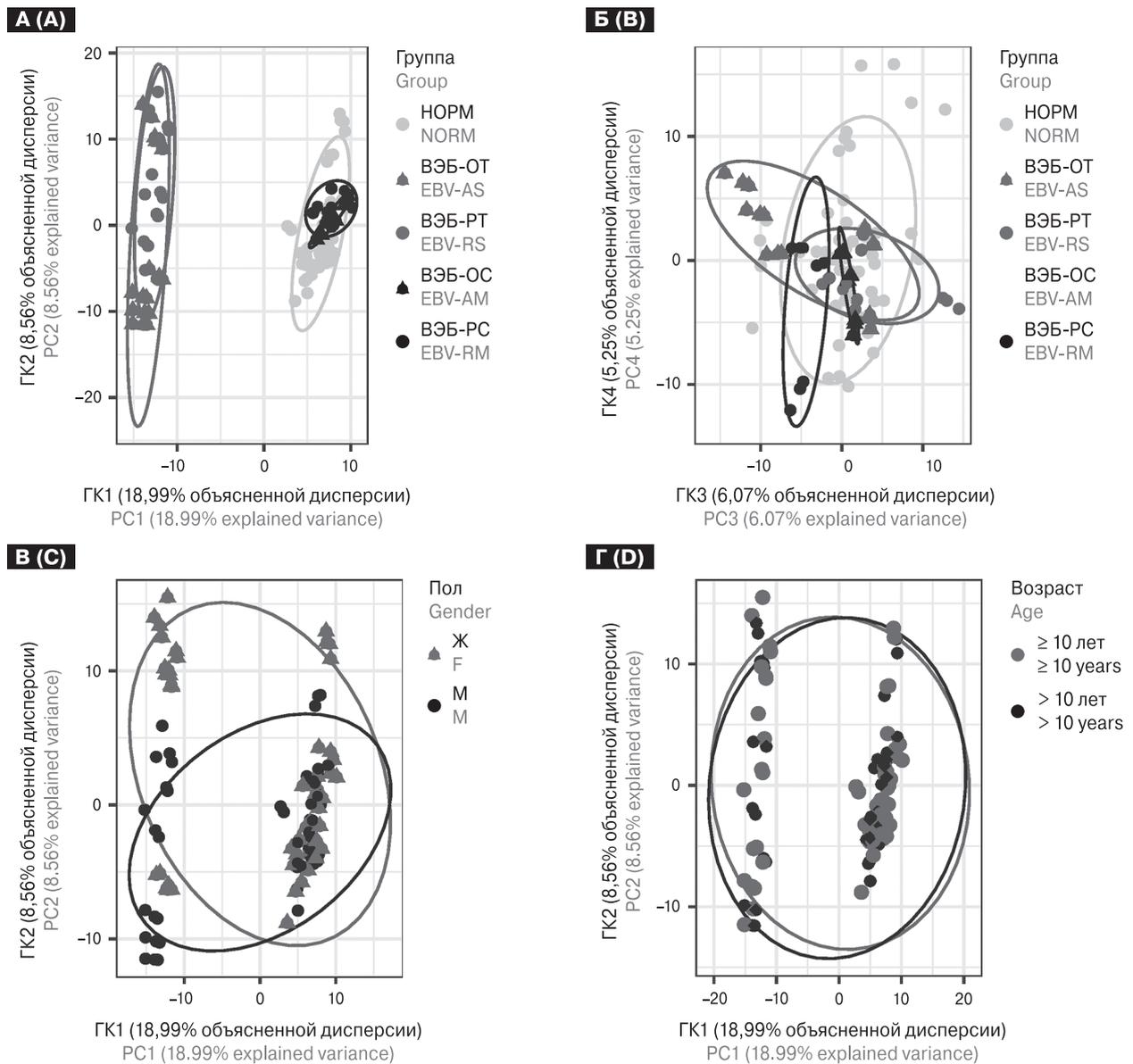
*Разведывательный анализ данных.* Нами проведен разведывательный анализ данных об уровнях экспрессии генов и транскриптов в лейкоцитах крови пациентов с ВЭБ-моноклеозом и практически здоровых доно-

ров. В результате анализа методом главных компонент было выделено 56 компонент, обладающих собственным значением более 1. Суммарно компоненты объясняли 98,41% исходной дисперсии. Визуализация образцов в координатах двух первых компонент показала, что разделение образцов может быть обусловлено формой течения заболевания (первая компонента), а для пациентов с тяжелой формой ВЭБ-ИМ также полом участников (вторая компонента, рис. 1А, В). Расхождение образцов в зависимости от стадии заболевания — острая инфекция или реконвалесценция — выявлено при анализе в координатах третьей компоненты (рис. 1Б), при этом разделение было более выражено у пациентов с ВЭБ-ИМ средней степени тяжести. Расхождения образцов в зависимости от возраста участников обнаружено не было (рис. 1Г).

*Выявление маркеров тяжелой формы течения ВЭБ-инфекции.* На данном этапе работы проведен анализ уровня экспрессии генов и транскриптов в исследуемых группах по сравнению с донорами. Также построены модели классификации для групп сравнения ВЭБ-ОТ — НОРМ, ВЭБ-ОС — НОРМ и ВЭБ-ОТ — ВЭБ-ОС (по 10 моделей для каждой пары групп). Для моделей классификации ВЭБ-ОТ — НОРМ средний показатель AUC составил  $0,97 \pm 0,11$ , для моделей классификации ВЭБ-ОС — НОРМ —  $0,99 \pm 0,02$ , для моделей классификации ВЭБ-ОТ — ВЭБ-ОС —  $1,00 \pm 0,00$ .

В результате анализа нами выделены кандидатные маркеры, позволяющие дифференцировать образцы в трех парах групп. Для групп сравнения ВЭБ-ОТ — НОРМ в перечень таких маркеров вошли гены BCL2L1, BCL2L11, BIRC3, BNIP1, CELF6, ELK1, FASTK, FOSB, HAX1, HNRNPH3, PCNA, PRKCZ, SNRBP и TRAP1, а также транскрипты BCL2.NM\_000633, KHDRBS2.NM\_152688, NOL3.NM\_001276307, SF1.NM\_201995, TNFRSF10C.NM\_003841 и XIAP.NM\_001167. Перечень кандидатных маркеров для групп сравнения ВЭБ-ОС — НОРМ составили ген RFFL и транскрипты VMF.NM\_033503, DFFB.NM\_004402, ELK3.NM\_005230, FASTK.NM\_033015, FPGS.NM\_001018078, HNRNPH1.NM\_001257293, NSMAF.NM\_001144772, PCNA.NM\_002592, PPIB.NM\_000942, PRKCH.NM\_006255, RFFL.ALL и XIAP.NR\_037916. Для групп сравнения ВЭБ-ОТ — ВЭБ-ОС кандидатными маркерами стали гены AIFM1, BCL2L1, BCL2L11, BIRC3, CELF6, ELK1, FPGS, KRAS, NAIP, SNRBP, USP19 и транскрипты AR.NM\_001011645, BBC3.NM\_001127242, CASP1.NM\_033294, FPGS.NM\_001018078, PCNA.NM\_002592, SF1.NM\_201995 и XIAP.NM\_001167.

После проведения процедуры логического исключения были отобраны гены и тран-



**Рисунок. Разведывательный анализ данных методом главных компонент**

Figure. Initial data analysis using principal components

А) Расположение образцов в координатах первой и второй главных компонент с оптическим наложением групп исследования. На рисунке отображены эллипсы нормального распределения образцов для каждой группы. Б) Расположение образцов в координатах третьей и четвертой главных компонент с оптическим наложением принадлежности к группе исследования. В) Расположение образцов в координатах первой и второй главных компонент с оптическим наложением пола участников исследования. Г) Расположение образцов в координатах первой и второй главных компонент с оптическим наложением возраста участников. ВЭБ-ОТ, ВЭБ-РТ — ВЭБ-инфекционный мононуклеоз тяжелой формы течения в острой фазе и после выздоровления, ВЭБ-ОС, ВЭБ-РС — ВЭБ-инфекционный мононуклеоз средней степени тяжести в острой фазе и после выздоровления, НОРМ — практически здоровые доноры.

A) The location of the samples in the coordinates of the first and second principal components with optical overlay of study groups. The ellipses represent the normal distribution of samples for each group. B) The location of the samples in the coordinates of the third and fourth principal components with optical overlay of study groups. C) The location of the samples in the coordinates of the first and second principal components with optical overlay of participants' gender. D) The location of the samples in the coordinates of the first and second principal components with optical overlay of participants' age. EBV-AS, EBV-RS — severe form of EBV-infectious mononucleosis in acute stage and after reconvalescence, EBV-AM, EBV-RM — moderate form of EBV-infectious mononucleosis in acute stage and after reconvalescence, NORM — healthy donors.

скрипты, экспрессия которых специфически изменялась при тяжелой форме ВЭБ-ИМ. Так, в крови пациентов с тяжелым течением заболевания выявлено повышение экспрессии генов BCL2L1, CELF6, SNRBP, а также снижение экспрессии генов BCL2L11, BIRC3, ELK1 и транскриптов SF1.NM\_201995 и XIAP.NM\_001167 по сравнению с практически здоровыми донорами. При ВЭБ-ИМ средней степени тяжести экспрессия указанных молекул не изменялась, за исключением гена ELK1 и транскрипта XIAP.NM\_001167, уровень представленности которых возрастал по сравнению с нормой (табл. 1, табл. 2–4 дополнительных материалов). Следует отметить, что выявленные изменения экспрессии маркерных молекул сохранялись и после выздоровления пациентов с тяжелой формой ВЭБ-ИМ (табл. 5 дополнительных материалов).

Нам также удалось выделить специфические маркеры ВЭБ-ИМ средней степени тяжести. В лейкоцитах крови пациентов с неосложненным течением заболевания наблюдали повышение экспрессии транскриптов FPGS.NM\_001018078 и PCNA.NM\_002592 по сравнению со здоровыми донорами. У пациентов с тяжелой формой ВЭБ-ИМ экспрессия этих мо-

лекул, наоборот, снижалась (табл. 1, табл. 2–4 дополнительных материалов). После выздоровления пациентов с ВЭБ-ИМ средней степени тяжести у них наблюдали нормализацию обоих показателей (табл. 6 дополнительных материалов).

*Исследование влияния пола пациента на экспрессию маркеров тяжелой формы течения ВЭБ-моноклеоза.* Поскольку разведывательный анализ данных показал возможное влияние пола на паттерн экспрессии изучаемых генов и транскриптов, мы провели сравнение экспрессии выявленных маркеров у пациентов с тяжелой формой ВЭБ-ИМ разного пола. Уровни экспрессии изучали в группах ВЭБ-ОТ и ВЭБ-РТ отдельно. При этом для сравнения использовали Т-тест с поправкой на множественные сравнения, а кратность изменения экспрессии FC рассчитывали как логарифм соотношения средних значений уровня экспрессии гена или транскрипта у пациентов мужского и женского пола по основанию 2.

В результате выявлено, что экспрессия маркеров ELK1 и SNRBP зависела от половой принадлежности пациентов. У пациентов мужского пола в острую фазу инфекции экспрессия ELK1 повышалась по сравнению с пациентами жен-

**Таблица 1. Экспрессия специфических маркеров тяжелой и среднетяжелой форм течения ВЭБ-инфекционного моноклеоза в лейкоцитах крови пациентов**

Table 1. Expression of specific markers of severe and moderate forms of EBV-infectious mononucleosis in patients' leukocytes

Маркер Marker	Изменение экспрессии в группах сравнения Change in expression in comparison groups					
	ВЭБ-ОТ — НОРМ EBV-AS — NORM		ВЭБ-ОС — НОРМ EBV-AM — NORM		ВЭБ-ОТ — ВЭБ-ОС EBV-AS — EBV-AM	
	FC; q	FI*	FC; q	FI*	FC; q	FI*
<b>Специфические маркеры тяжелой формы течения ВЭБ-инфекционного моноклеоза</b> Specific markers of severe form of EBV-infectious mononucleosis						
BCL2L1	2,04; q < 0,001	12,63	-1,32; q = 0,339	–	3,36; q < 0,001	0,00
BCL2L11	-4,40; q = 0,002	0,51	-1,08; q = 0,457	–	-2,99; q < 0,001	0,00
BIRC3	-3,62; q < 0,001	0,37	0,21; q = 0,571	–	-3,83; q < 0,001	0,00
CELF6	2,04; q < 0,001	0,02	-5,24; q = 0,092	–	7,28; q < 0,001	0,00
ELK1	-2,95; q < 0,001	0,20	1,04; q = 0,003	–	-3,99; q < 0,001	0,00
SF1.NM_201995	-3,45; q < 0,001	0,00	-0,38; q = 0,649	–	-3,07; q < 0,001	0,00
SNRBP	2,09; q < 0,001	0,49	-4,07; q = 0,369	–	6,16; q < 0,001	0,00
XIAP.NM_001167	-1,47; q < 0,001	2,47	1,67; q < 0,001	–	-3,12; q < 0,001	0,00
<b>Специфические маркеры ВЭБ-инфекционного моноклеоза средней степени тяжести</b> Specific markers of moderate form of EBV-infectious mononucleosis						
FPGS.NM_001018078	-1,16; q = 0,003	–	2,20; q < 0,001	6,66	-3,36; q < 0,001	0,00
PCNA.NM_002592	-0,92; q < 0,001	–	2,05; q < 0,001	6,24	-2,97; q < 0,001	0,00

**Примечание.** ВЭБ-ОТ — острый ВЭБ-инфекционный моноклеоз тяжелой формы течения, ВЭБ-ОС — острый ВЭБ-инфекционный моноклеоз средней степени тяжести, НОРМ — практически здоровые доноры. \*Для генов и транскриптов, не вошедших в список кандидатных маркеров соответствующей группы, значимость для классификации не указана.

Note. EBV-AS — severe form of acute EBV-infectious mononucleosis, EBV-AM — moderate form of EBV-infectious mononucleosis, NORM — healthy donors. \*For genes and transcripts not included in the list of candidate markers of the corresponding group, feature importance is not shown.

**Таблица 2. Экспрессия специфических маркеров тяжелой формы течения ВЭБ-инфекционного мононуклеоза в лейкоцитах крови пациентов разного пола**

Table 2. Expression of specific markers of severe form of EBV-infectious mononucleosis in the blood leukocytes of patients of different sexes

Маркер Marker	Изменение экспрессии у мужчин (n = 9) по сравнению с женщинами (n = 9): FC; значение q Change of expression in men (n = 9) compared with women (n = 9): FC; q-value	
	острая фаза инфекции acute infection	после выздоровления after recovery
BCL2L1	0,04; q = 0,615	-2,30; q < 0,001
BCL2L11	0,12; q = 0,445	0,03; q = 0,746
BIRC3	-0,11; q = 0,615	0,22; q = 0,312
CELF6	-0,13; q = 0,399	-0,25; q = 0,213
ELK1	0,986; q < 0,001	-0,80; q = 0,002
SF1.NM_201995	-0,02; q = 0,910	-0,16; q = 0,539
SNRPB	-0,30; q = 0,047	-0,52; q = 0,023
XIAP.NM_001167	-0,28; q = 0,399	0,22; q = 0,283

ского пола, а уровень экспрессии SNRPB, наоборот, снижался (табл. 2). После выздоровления пациентов мужского пола экспрессия обоих маркеров в крови снижалась по сравнению с пациентами женского пола. Следует отметить, что нами также выявлено снижение экспрессии гена BCL2L1 у мужчин по сравнению с женщинами, но только в стадии реконвалесценции. Кроме того, экспрессия гена BCL2L1 характеризовалась неравномерным распределением в группе практически здоровых доноров (об этом свидетельствовало высокое значение стандартного отклонения показателя по сравнению со средним, см. табл. 2, 3 дополнительных материалов), что также говорит о зависимости экспрессии гена от пола обследуемого либо иных неучитываемых факторов.

В связи с полученными данными, гены BCL2L1, ELK1 и SNRPB были исключены из перечня специфических маркеров тяжелой формы течения ВЭБ-инфекционного мононуклеоза.

## Обсуждение

На сегодняшний день накоплен значительный объем знаний о способности ВЭБ регулировать апоптоз и пролиферацию иммунокомпетентных клеток. Известно, что первичная острая ВЭБ-инфекция сопровождается пролиферацией пораженных В-лимфоцитов, а в условия *in vitro* и их иммортализацией [16]. При анализе транскриптома инфицированных В-клеток наблюдали изменение экспрессии групп генов, регулирующих митоз, клеточный цикл и p53-зависимый апоптоз. При этом индукция генов-участников NF-κB-сигнальных путей, как и NF-κB-зависимых генов, происходила на более поздних стадиях развития за-

болевания [17]. Похожие результаты получены при анализе генной экспрессии в периферической крови пациентов с ВЭБ-ИМ: наиболее активно экспрессирующиеся гены принадлежали к функциональной группе регуляторов клеточного цикла и участников IFN I-зависимого ответа [7]. Особенности генной экспрессии при тяжелых формах течения ВЭБ-инфекции в научной литературе не освещены.

В результате нашего исследования выявлен набор молекул — маркеров тяжелой формы течения ВЭБ-ИМ. Паттерн изменения экспрессии выделенных маркеров является специфическим для тяжелой формы течения заболевания, поскольку не наблюдается при ВЭБ-ИМ средней степени тяжести, а также не зависит от пола и возраста пациентов. По сравнению с практически здоровыми донорами, у пациентов с тяжелой формой течения ВЭБ-ИМ в крови выявлено снижение экспрессии генов BCL2L11, BIRC3, транскриптов SF1.NM\_201995 и XIAP.NM\_001167, а также усиление экспрессии гена CELF6. Выявленные маркеры относятся к двум функциональным группам: регуляторы апоптоза (BCL2L11, BIRC3, XIAP) и факторы сплайсинга пре-мРНК (CELF6, SF1).

Продукт гена BCL2L11 (BCL2 like 11, BAM, BIM, BOD), связываясь с другими белками семейства BCL2 на мембране митохондрий, обуславливает высвобождение цитохрома C и запуск митохондриального пути апоптоза. Известна способность ВЭБ подавлять экспрессию BCL2L11 в пораженных В-лимфоцитах, что обуславливает их выживание, усиленную пролиферацию и возможное злокачественное перерождение [20]. Описанный эффект связан с воздействием вирусных нуклеарных протеинов EBNA3A и EBNA3C, реализуется на ран-

них стадиях инфекции и не требует LMP-1-зависимой активации NF-κB [8, 15]. В нашем исследовании показано снижение экспрессии гена BCL2L11 более чем в 20 раз при развитии тяжелой формы ВЭБ-ИМ, что создает предпосылки для ингибирования митохондриального пути апоптоза и усиления экспансии пораженных вирусом иммунокомпетентных клеток.

Продукты других маркерных генов — BIRC3 и XIAP — обладают схожей способностью подавлять апоптоз, связываясь с адаптерами для рецептора фактора некроза опухоли TRAF-1 и TRAF-2. Дополнительно BIRC3 (baculoviral IAP repeat containing 3, API1, API2, MHC) является регулятором неканонического пути активации NF-κB. Снижение экспрессии BIRC3 при хроническом лимфолейкозе является плохим диагностическим признаком, поскольку сопровождается индукцией экспрессии NF-κB-зависимых генов и пролиферацией злокачественных клеток [4]. Вирусная микро-РНК ВЭБ miR-BHRF1-2 способна подавлять экспрессию BIRC3 в инфицированных клетках, хотя основными ее мишенями являются гены-участники IL-1-зависимого противовирусного иммунного ответа [19].

Продукт гена XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis, BIRC4, PI3, XLP2) — многофункциональный белок, участвующий в реализации антибактериального иммунитета и подавлении IL-1-индуцированного апоптоза в клетках иммунной системы. Генетические мутации гена, приводящие к снижению его экспрессии, являются одной из причин развития X-сцепленного лимфопролиферативного синдрома — наследственного расстройства иммунной системы с широким спектром клинических проявлений [21]. У пациентов с лимфопролиферативным синдромом развивается аномальный ответ на ВЭБ-инфекцию, сопровождающийся усилением цитотоксической активности и активационно-индуцированного апоптоза ВЭБ-специфических иммунных клеток [12, 18]. Наши результаты показывают, что снижение экспрессии транскрипта XIAP.NM\_001167 ассоциировано с тяжелым течением ВЭБ-ИМ даже у пациентов, не страдающих X-сцепленным лимфопролиферативным синдромом (ни у одного из пациентов не были зафиксированы клинические признаки синдрома; кроме того, в группу обследуемых были включены пациенты женского пола, не подверженные заболеванию). Следует отметить, что помимо снижения экспрессии транскрипта XIAP.NM\_001167, у пациентов с тяжелой формой ВЭБ-ИМ снижался уровень экспрессии другого транскрипта XIAP.NM\_001204401, а также самого гена XIAP (табл. 2 дополнительных материалов). Оба транскрипта XIAP кодируют один белок, однако изменение экспрессии маркерного транскрипта

было более выражено. Выявленное нами снижение экспрессии маркерных молекул BIRC3 и XIAP.NM\_001204401 может свидетельствовать об усилении TRAF-зависимого апоптоза иммунокомпетентных клеток при развитии тяжелой формы ВЭБ-инфекции.

Другие выявленные нами маркеры тяжелой формы течения ВЭБ-инфекции, являющиеся факторами сплайсинга (ген CELF6 и транскрипт SF1.NM\_201995), демонстрировали разнонаправленное изменение экспрессии при тяжелом ВЭБ-ИМ. Белок CELF6 (CUGBP Elav-like family member 6, BRUNOL6) экспрессируется преимущественно в тканях почек, головного мозга, сердца и печени, а в клетках крови представлен в незначительном количестве [11]. Значительное повышение экспрессии маркера в крови при тяжелой форме ВЭБ-инфекции может свидетельствовать как об активации нехарактерных для лейкоцитов крови механизмов сплайсинга пре-мРНК, так и о возникновении полиорганных поражений с вовлечением сердечно-сосудистой, выделительной, центральной и периферической нервной систем.

Фактор SF1 (splicing factor 1, BBP, MBBP, ZFM1) участвует в ранней сборке сплайсосомы и выборе альтернативных сайтов сплайсинга [6]. Высокий уровень экспрессии SF1 характерен для клеток костного мозга, лимфатических узлов, селезенки. Транскрипт SF1.NM\_201995 отличается от «основного» варианта мРНК SF1 отсутствием сегментов в 3'-нетранслируемом регионе и кодирующей части, что приводит к сдвигу рамки считывания и трансляции более короткого протеина с иной последовательностью аминокислот на С-конце. Длина С-конца SF1 влияет на его взаимодействие с другими компонентами сплайсосомы и обуславливает селекцию сайта сплайсинга [3, 5]. Выбор сайта сплайсинга определяет долю представленности различных транскриптов одного гена в клетке, тем самым регулируя функцию гена [2]. Таким образом, снижение экспрессии транскрипта SF1.NM\_201995 более чем в 10 раз при развитии тяжелой формы ВЭБ-ИМ может иметь важные, но пока не выясненные функциональные и клинически значимые последствия.

Необходимо отметить, что выраженные изменения экспрессии маркерных генов и транскриптов при тяжелой форме течения ВЭБ-ИМ сохранялись и после выздоровления пациентов. Полученный результат говорит о формировании длительных, стойких изменений отдельных структурно-функциональных элементов транскриптома в иммунокомпетентных клетках пациентов при тяжелой форме течения инфекции и определяет необходимость молекулярно-иммунологического мониторинга на стадии острой инфекции и после выздоровления.

## Заключение

Выявлен набор молекулярно-генетических маркеров тяжелой формы течения ВЭБ-инфекции. По сравнению с практически здоровыми донорами, у пациентов с тяжелой формой течения ВЭБ-инфекции в крови выявлено снижение экспрессии генов BCL2L11, BIRC3, транскриптов SF1.NM\_201995 и XIAP.NM\_001167, а также усиление экспрессии гена CELF6. Выявленные изменения экспрессии

маркеров специфичны для тяжелой формы заболевания, не проявляются при инфекции средней тяжести и не зависят от пола и возраста пациентов. Полученный набор маркеров можно использовать при разработке специфических средств прогнозирования рисков возникновения тяжелой формы течения ВЭБ-ИМ и молекулярно-иммунологического мониторинга на разных стадиях инфекционного процесса, а также в качестве перспективных мишеней для средств таргетной терапии.

## Список литературы/References

1. Солнцев Л.А., Старикова В.Д., Сахарнов Н.А., Князев Д.И., Уткин О.В. Стратегия подбора зондов для изучения совокупности мРНК участников рецептор-опосредованного сигналинга апоптоза // Молекулярная биология. 2015. Т. 49, № 3. С. 457–465. [Solntsev L.A., Starikova V.D., Sakharnov N.A., Knyazev D.I., Utkin O.V. Strategy of probe selection for studying mRNAs that participate in receptor-mediated apoptosis signaling. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology*, 2015, vol. 49, no. 3, pp. 457–465. doi: 10.7868/S0026898415030167 (In Russ.)]
2. Филатова Е.Н., Уткин О.В. Роль некодирующих изоформ мРНК белок-кодирующих генов в регуляции генной экспрессии // Генетика. 2018. Т. 54, № 8. С. 879–887. [Filatova E.N., Utkin O.V. The role of noncoding mRNA isoforms in the regulation of gene expression. *Genetika = Russian Journal of Genetics*, 2018, vol. 54, no. 8, pp. 879–887. doi: 10.1134/S0016675818080052 (In Russ.)]
3. Arning S., Grüter P., Bilbe G., Krämer A. Mammalian splicing factor SF1 is encoded by variant cDNAs and binds to RNA. *RNA*, 1996, vol. 2, no. 8, pp. 794–810.
4. Asslaber D., Watch N., Leisch M., Qi Y., Maeding N., Hufnagl C., Jansko B., Zaborsky N., Villunger A., Hartmann T.N., Greil R., Egle A. BIRC3 expression predicts CLL progression and defines treatment sensitivity via enhanced NF-κB nuclear translocation. *Clin. Cancer Res.*, 2018, vol. 25, no. 6, pp. 1901–1912. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1548
5. Caslini C., Spinelli O., Cazzaniga G., Golay J., De Gioia L., Pedretti A., Breviaro F., Amaru R., Barbui T., Biondi A., Introna M., Rambaldi A. Identification of two novel isoforms of the ZNF162 gene: a growing family of signal transduction and activator of RNA proteins. *Genomics*, 1997, vol. 42, no. 2, pp. 268–277. doi: 10.1006/geno.1997.4705
6. Corioni M., Antih N., Tanackovic G., Zavolan M., Krämer A. Analysis of in situ pre-mRNA targets of human splicing factor SF1 reveals a function in alternative splicing. *Nucleic Acids Res.*, 2011, vol. 39, no. 5, pp. 1868–1879. doi: 10.1093/nar/gkq1042
7. Dunmire S.K., Odumade O.A., Porter J.L., Reyes-Genere J., Schmeling D.O., Bilgic H., Fan D., Baechler E.C., Balfour H.H. Jr., Hogquist K.A. Primary EBV infection induces an expression profile distinct from other viruses but similar to hemophagocytic syndromes. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 1: e85422. doi: 10.1371/journal.pone.0085422
8. Fitzsimmons L., Boyce A.J., Wei W., Chang C., Croom-Carter D., Tierney R.J., Herold M.J., Bell A.I., Strasser A., Kelly G.L., Rowe M. Coordinated repression of BIM and PUMA by Epstein–Barr virus latent genes maintains the survival of Burkitt lymphoma cells. *Cell Death Differ.*, 2018, vol. 25, no. 2, pp. 241–254. doi: 10.1038/cdd.2017.150
9. Fu Q., He C., Mao Z. Epstein–Barr virus interactions with the Bcl-2 protein family and apoptosis in human tumor cells. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, 2013, vol. 14, no. 1, pp. 8–24. doi: 10.1631/jzus.B1200189
10. Houldcroft C.J., Kellam P. Host genetics of Epstein–Barr virus infection, latency and disease. *Rev. Med. Virol.*, 2015, vol. 25, no. 2, pp. 71–84. doi: 10.1002/rmv.1816
11. Ladd A.N., Nguyen H.N., Malhorta K., Cooper A. CELF6, a member of the CELF family of RNA-binding proteins, regulates muscle-specific splicing enhancer-dependent alternative splicing. *J. Biol. Chem.*, 2004, vol. 279, no. 17, pp. 17756–17764. doi: 10.1074/jbc.M310687200
12. Lopez-Granados E., Stacey M., Kienzler A.-K., Sierro S., Willberg C.B., Fox C.P., Rigaud S., Long H.M., Hislop A.D., Rickinson A.B., Patel S., Latour S., Klenerman P., Chapel H. A mutation in X-linked inhibitor of apoptosis (G466X) leads to memory inflation of Epstein–Barr virus-specific T cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 2014, vol. 178, no. 3, pp. 470–482. doi: 10.1111/cei.12427
13. McAulay K.A., Higgins C.D., Macsween K.F., Lake A., Jarrett R.F., Robertson F.L., Williams H., Crawford D.H. HLA class I polymorphisms are associated with development of infectious mononucleosis upon primary EBV infection. *J. Clin. Invest.*, 2007, vol. 117, no. 10, pp. 3042–3048. doi: 10.1172/JCI32377
14. Pender M.P. CD8<sup>+</sup> T-cell deficiency, Epstein–Barr virus infection, vitamin D deficiency, and steps to autoimmunity: a unifying hypothesis. *Autoimmune Dis.*, 2012, vol. 2012: 189096. doi: 10.1155/2012/189096
15. Price A.M., Dai J., Bazot Q., Patel L., Nikitin P.A., Djavadian R., Winter P.S., Salinas C.A., Barry A.P., Wood K.C., Johannsen E.C., Letai A., Allday M.J., Luftig M.A. Epstein–Barr virus ensures B cell survival by uniquely modulating apoptosis at early and late times after infection. *eLife*, 2017, vol. 6: e22509. doi: 10.7554/eLife.22509
16. Price A.M., Luftig M.A. Dynamic Epstein–Barr virus gene expression on the path to B-cell transformation. *Adv. Virus Res.*, 2014, vol. 88, pp. 279–313. doi: 10.1016/B978-0-12-800098-4.00006-4
17. Price A.M., Tourigny J.P., Forte E., Salinas R.E., Dave S.S., Luftig M.A. Analysis of Epstein–Barr virus-regulated host gene expression changes through primary B-cell outgrowth reveals delayed kinetics of latent membrane protein 1-mediated NF-κB activation. *J. Virol.*, 2012, vol. 86, no. 20, pp. 11096–11106. doi: 10.1128/JVI.01069-12

18. Rigaud S., Fondanèche M.-C., Lambert N., Pasquier B., Ateo V., Soulas P., Galicier L., Le Deist F., Rieux-Laucat F., Revy P., Fischer A., de Saint Basile G., Latour S. XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. *Nature*, 2006, vol. 444, no. 7115, pp. 110–114. doi: 10.1038/nature05257
19. Skinner C.M., Ivanov N.S., Barr S.A., Chen Y., Skalsky R.L. An Epstein–Barr virus microRNA blocks interleukin-1 (IL-1) signaling by targeting IL-1 receptor 1. *J. Virol.*, 2017, vol. 91, no. 21: e00530-17. doi: 10.1128/JVI.00530-17
20. Wood C.D., Veenstra H., Khasnis S., Gunnel A., Webb H.M., Shannon-Lowe C., Andrews S., Osborne C.S., West M.J. MYC activation and BCL2L1 silencing by a tumour virus through the large-scale reconfiguration of enhancer-promoter hubs. *eLife*, 2016, vol. 5: e18270. doi: 10.7554/eLife.18270
21. Worth A.J.J., Houldcroft C.J., Booth C. Severe Epstein–Barr virus infection in primary immunodeficiency and the normal host. *Br. J. Haematol.*, 2016, vol. 175, no. 4, pp. 559–576. doi: 10.1111/bjh.14339

---

**Авторы:**

**Филатова Е.Н.**, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;

**Сахарнов Н.А.**, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;

**Уткин О.В.**, к.б.н., зав. лабораторией молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;

**Кулова Е.А.**, к.м.н., доцент кафедры инфекционных болезней Приволжского исследовательского медицинского университета, Нижний Новгород, Россия.

**Authors:**

**Filatova E.N.**, PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

**Sakharnov N.A.**, Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

**Utkin O.V.**, PhD (Biology), Head of the Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

**Kulova E.A.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Infectious Diseases Department, Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russian Federation.

---

Поступила в редакцию 13.09.2019  
Отправлена на доработку 15.01.2020  
Принята к печати 14.03.2020

---

Received 13.09.2019  
Revision received 15.01.2020  
Accepted 14.03.2020

# ОЦЕНКА ВОЗРАСТНОЙ СТРУКТУРЫ БОЛЬНЫХ КОРЬЮ С ПЕРВИЧНЫМ И ВТОРИЧНЫМ ИММУННЫМ ОТВЕТОМ ЗА ПЕРИОД 2010–2016 гг. В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Т.А. Мамаева<sup>1</sup>, Н.В. Железнова<sup>2</sup>, М.А. Бичурина<sup>2</sup>, М.А. Наумова<sup>1</sup>,  
М.В. Говорукина<sup>3</sup>, А.П. Топтыгина<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия

<sup>2</sup> ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> ФГУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия

**Резюме.** Материалом исследования служили сыворотки крови 5539 лиц в возрасте < 1–60 лет с клинически и лабораторно подтвержденной коревой инфекцией за 2010–2016 гг. Для всех больных корью определен тип иммунного ответа: первичный или вторичный. В исследование включены: дети < 1–14 лет (2381), подростки 15–17 лет (189) и взрослые 18–60 лет (2969). Тестирование сывороток на IgM проводилось с помощью тест-систем «ВектоКорь IgM» (Россия); определение концентрации и степени авидности IgG — «Anti-Measles Viruses ELISA/IgG» и «Avidity: Anti-Measles Viruses ELISA/IgG» (Euroimmun, Германия). В основу интерпретации первичного иммунного ответа положено наличие в сыворотке специфических IgM и низкоавидных IgG. Вторичный иммунный ответ — положительный результат IgM и высокоавидные IgG в концентрации  $\geq 5,0$  МЕ/мл. Результаты исследования показали, что заболеваемость корью в 2010–2016 гг. поддерживалась детьми 1–2 лет — 39,9% от общего числа заболевших корью детей < 1–14 лет, а также взрослыми 18–40 лет — 80,1% от общего числа больных 15–60 лет. В сыворотках крови 5539 больных в 15,0% случаях IgG выявлены в диапазоне 8,5–45,0 МЕ/мл ( $21,4 \pm 0,36$ ) и имели высокую степень авидности от 80 до 100% ( $92,5 \pm 0,2$ ). В остальных 85,0% случаев IgG были низкоавидными (< 30%) с концентрацией 0,2–3,46 МЕ/мл ( $1,73 \pm 0,03$ ). Анализ результатов показал, что у всех детей в возрасте до 14 лет формировался первичный иммунный ответ. Больных в возрасте 15–60 лет с первичным иммунным ответом, заболевание у которых можно было предотвратить вакцинацией, было 73,7%; лиц с «вакцинными неудачами» — 26,3%. Процент больных с «вакцинными неудачами» в годы относительного эпидемиологического благополучия — 2010 г. (0,09 на 100 тыс. населения) и 2016 г. (0,12 на 100 тыс. населения) составлял 35,3 и 18,2% соответственно, превышая 9,9% ( $p < 0,001$ ) — показатель периода высокой заболеваемости в 2014 г. (3,24 на 100 тыс. населения). Полученные результаты свидетельствуют о циркуляции вируса кори среди лиц с «вакцинными неудачами», что может являться потенциалом распространения и заражения незащищенных групп населения и причиной возникновения вспышек кори в период эпидемиологического благополучия.

**Ключевые слова:** корь, заболеваемость корью, возрастная структура, специфические антитела класса IgM, специфические антитела класса IgG, низкоавидные антитела, высокоавидные антитела, первичный иммунный ответ, вторичный иммунный ответ.

## Адрес для переписки:

Мамаева Тамара Алексеевна  
125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10,  
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.  
Тел.: 8 (495) 452-28-26 (служебн.); 8 903 558-10-70 (моб.).  
E-mail: 4522826@bk.ru

## Contacts:

Tamara A. Mamaeva  
125212, Russian Federation, Moscow, Admiral Makarov str., 10,  
G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology  
and Microbiology.  
Phone: +7 (495) 452-28-26 (office); +7 903 558-10-70 (mobile).  
E-mail: 4522826@bk.ru

## Библиографическое описание:

Мамаева Т.А., Железнова Н.В., Бичурина М.А., Наумова М.А.,  
Говорукина М.В., Топтыгина А.П. Оценка возрастной структуры больных  
корью с первичным и вторичным иммунным ответом за период  
2010–2016 гг. в Российской Федерации // Инфекция и иммунитет. 2020.  
Т. 10, № 4. С. 717–728. doi: 10.15789/2220-7619-EOA-1407

## Citation:

Mamaeva T.A., Zheleznova N.V., Bichurina M.A., Naumova M.A.,  
Govorukhina M.V., Toptygina A.P. Evaluation of age-related distribution  
of measles cases with primary and secondary immune response in Russian  
Federation, 2010–2016 // Russian Journal of Infection and Immunity =  
Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 4, pp. 717–728. doi: 10.15789/2220-  
7619-EOA-1407

## EVALUATION OF AGE-RELATED DISTRIBUTION OF MEASLES CASES WITH PRIMARY AND SECONDARY IMMUNE RESPONSE IN RUSSIAN FEDERATION, 2010–2016

Mamaeva T.A.<sup>a</sup>, Zheleznova N.V.<sup>b</sup>, Bichurina M.A.<sup>b</sup>, Naumova M.A.<sup>a</sup>, Govorukhina M.V.<sup>c</sup>, Toptygina A.P.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Gabrichesky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation*

<sup>b</sup> *St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation*

<sup>c</sup> *Center of Hygiene and Epidemiology in the Rostov Region, Rostov-on-Don, Russian Federation*

**Abstract.** In 2010–2016, blood serum samples were examined from 5539 patients, aged < 1–60 years, with clinically and laboratory confirmed measles. Primary or secondary type of immune response was determined for all measles cases. Studies were performed with children aged < 1–14 years (2381), adolescents, 15–17 years old (189), and adults aged 18–60 years (2969). Serum measles-specific IgM antibodies were measured by “VektoKor’ IgM” ELISA test system (Russia), concentration and avidity of specific IgG — by using “Anti-Measles Viruses ELISA/IgG” and “Avidity: Anti-Measles Viruses ELISA/IgG” (Euroimmun, Germany). Primary immune response was identified based on the presence of serum measles-specific low avidity IgM and IgG antibodies, whereas secondary immune response was characterized by detecting high avidity IgM and IgG antibodies at concentration of  $\geq 5.0$  IU/ml. Analyzing measles-specific IgM antibodies in 2010–2016 demonstrated that measles morbidity was mainly due to children, aged 1–2 years reaching up to 39.9% of the total number of children with measles aged < 1–14 years as well as adults aged 18–40 years old comprising as high as 80.1% total number of patients aged 15–60 years. Serum measles-specific IgG testing showed that in 15.0% of cases they were detected at concentration of  $\geq 5.0$  IU/ml. Further serum dilution resulted in finding IgG titer ranging within 8.5–45.0 IU/ml ( $21.4 \pm 0.36$ ) and high avidity antibodies in 80–100% ( $92.5 \pm 0.2$ ) cases. The remaining 85.0% cases found low avidity measles-specific IgG antibodies (< 30%) at concentration of 0.2–3.46 IU/ml ( $1.73 \pm 0.03$ ). An age-related analysis of our data demonstrated that all children under 14 with laboratory-confirmed measles developed primary immune response. Moreover, in 73.7% of measles patients aged 15–60 with primary immune response measles might be prevented by timely vaccination, whereas persons with “vaccine failure” comprised 26.3%. In 2010 (0.09 per 100,000 subjects) and 2016 (0.12 per 100,000 subjects), frequency of patients with “vaccine failure” during relative epidemic well-being was 35.3% and 18.2%, respectively, exceeding 9.9% ( $p < 0.001$ ) serving as a hallmark 2014 high measles incidence rate (3.24 per 100,000 subjects). The data obtained indicate that measles virus circulate among people with “vaccine failure,” which may account for potential to spread and infect unprotected population cohorts as well as cause measles outbreaks during periods of epidemic well-being.

**Key words:** measles, measles incidence rate, age-related distribution, specific IgM antibodies, specific IgG antibodies, low avidity, high avidity, primary immune response, secondary immune response.

## Введение

История создания вакцины против кори берет свое начало с 1954 г., когда впервые был выделен вирус кори [23]. Введение противокоревой вакцинации по всему миру (1963–1968 гг.) — одно из самых успешных мероприятий здравоохранения современности. Только с 2000 г. было предотвращено более 21 млн случаев смерти от кори во всем мире [49, 54]. Государства — члены Европейского региона Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) более 10 лет назад приняли резолюцию об элиминации кори и краснухи. Однако до сих пор только 21 из 53 стран достигла этой цели [29]. Несмотря на то что в 2018 г. некоторые страны, например Австрия и Швейцария, приобрели статус стран, где корь элиминирована, в том же году потеряли этот статус такие государства, как Великобритания, Бразилия, Греция, Венесуэла, Чехия, Албания. На грани потери этого статуса находятся и США [54]. В сентябре 2019 г. ВОЗ объявила о принятии первого в истории Плана стратегического реагирования (ПСР) с чрезвычайными мерами по выяснению причин появления вспышек и активизации мер борьбы с коревой инфекцией в каждой стране. Принятие

стратегического плана в значительной степени было обусловлено тем, что, несмотря на документально подтвержденный высокий уровень охвата плановой иммунизацией, регистрируется рекордное число больных корью [35].

Для достижения элиминации кори рекомендуемый популяционный иммунитет, с учетом получения 2 доз вакцины, должен составлять 95% и выше. Эта цель была подтверждена в работе Funk S. и соавт. совместно с ВОЗ и CDC (Атланта, США) при анализе результатов сравнительных серологических исследований популяционного иммунитета и случаев заболевания корью в 17 странах [24]. Значимость выявленных постинфекционных коревых антител и их защитная роль были автоматически перенесены на показатели гуморального поствакцинального иммунитета. Возможность такого переноса обусловлена тем, что была выявлена прямая корреляционная связь между наличием специфических антител и защитой от коревой инфекции [11, 17]. В пользу использования коревых вакцин свидетельствуют и особенности формирования поствакцинального иммунитета, сопровождающегося краткосрочной иммуносупрессией, тогда как становление постинфекционного иммунитета характеризуется долгосроч-

ным иммунодепрессивным эффектом, оказывающим более длительное (в течение 2–3 лет) влияние на устойчивость организма к другим инфекционным заболеваниям [19, 26, 38, 39].

Важно признать, что каждая страна самостоятельно, с учетом своих материально-технических, финансовых и лабораторных ресурсов, определяет необходимость проведения серологических исследований по выявлению и подтверждению случаев кори [34, 53]. До последнего времени для широкомасштабных диагностических исследований ВОЗ было рекомендовано определение одного специфического маркера к вирусу кори — IgM [33] — и использование ИФА, так как этот метод считается более доступным и его возможности не ограничиваются периодом вирусемии [4, 29, 34, 46, 53]. В условиях подъема заболеваемости и вовлечения в эпидемический процесс лиц, в анамнезе которых зарегистрирована коревая вакцинация или чей вакцинный статус был неизвестен [3, 13, 14, 16, 18, 22, 27, 28, 32, 41, 43, 44, 47, 48, 51, 55], эта рекомендация была пересмотрена. Новое руководство ВОЗ по лабораторной диагностике кори указывает на целесообразность проведения комплексных лабораторных исследований с применением тестов для определения не только IgM, но и количественных и качественных (степень avidности) показателей IgG, позволяющих дифференцировать первичный и вторичный иммунный ответ [34, 53].

В связи с вышеизложенным, целью настоящего исследования явилось определение возрастной структуры больных корью с первичным и вторичным иммунным ответом за 2010–2016 гг. в Российской Федерации.

Для этого было необходимо решить следующие задачи:

- оценить заболеваемость корью обследуемых лиц разного возраста в период наблюдения (2010–2016);
- провести подтверждающее тестирование сывороток больных с клинически и лабораторно подтвержденной корью на IgM;
- определить концентрацию и степень avidности специфических IgG в сыворотках крови больных;
- сопоставить полученные лабораторные данные с показателями заболеваемости корью в целом по стране за 2010–2016 гг.

## Материалы и методы

Материалом исследования явились 5539 сывороток, полученных за 2010–2016 гг. от больных корью лиц в возрасте от < 1 года до 60 лет, с выявленным положительным результатом по IgM на 4–7 день после появления сыпи. Наличие IgM-антител было определено мето-

дом ИФА с помощью тест-систем «ВектоКорь IgM» в лабораториях 10 региональных центров (РЦ) России, входящих в лабораторную сеть ВОЗ и стран СНГ по диагностике кори и краснухи [5, 9].

В настоящее исследование были включены:

- дети в возрасте от < 1 года до 14 лет — 2381 пациент, из них возрастную группу < 1 года составили 559, 1–2 года — 951, 3–6 лет — 511 и 7–14 лет — 360 больных;
- подростки в возрасте 15–17 лет — 189 больных;
- взрослые в возрасте 18–60 лет — 2969 пациентов, из которых возрастную группу 18–30 лет составили 1513, 31–40 лет — 1018, 41–50 лет — 341 и 51–60 лет — 97 больных.

Подтверждающее тестирование сывороток на IgM, определение концентрации и степени avidности специфических IgG проводилось на базе референс-лаборатории ЕРБ ВОЗ, МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского (Москва).

Специфическую активность противокоревых антител класса IgM в образцах сывороток определяли методом ИФА по величине оптической плотности (ОП) в о.е. с использованием тест-системы «ВектоКорь IgM» (АО «Вектор-Бест», Россия) «capture» варианта, согласно нормативно-технической документации на тест-систему с учетом пороговой величины — ОПпор. = (K<sup>-</sup>ср.+0,2).

Оценку специфической активности образцов сыворотки по IgG выражали количественно в международных единицах (МЕ/мл) согласно нормативно-технической документации на используемую тест-систему «Anti-Measles Viruses ELISA/IgG» «indirect» формата (Euroimmun, Германия). При содержании антител в сыворотке  $\geq 0,275$  МЕ/мл результат расценивался как положительный; результат < 0,2 МЕ/мл — отрицательный. При высоких показателях ОП IgG, превышающих значение встроеного в тест-систему положительного контроля (K<sup>+</sup> = 5 МЕ/мл), использовали способ двукратного шага разведений образцов согласно инструкции на тест-систему.

Степень avidности IgG определяли с использованием тест-системы «Avidity:Anti-Measles Viruses ELISA/IgG» (Euroimmun, Германия) «indirect» формата с сорбированным коревым антигеном; показатель низкой степени avidности — менее 40%, для высокой степени avidности — более 60%. Во избежание ложных результатов при определении степени avidности IgG исследования проводили в одном диапазоне значений ОП (0,2–0,8 о.е.).

Анализ полученных данных проводили без учета вакцинного статуса больных из-за отсутствия у большинства пациентов (67,0%) такой информации.

В основу интерпретации первичного иммунного ответа было положено наличие специфических IgM и низкоавидных IgG в сыворотках больных на 4–7 день после сыпи; вторичный иммунный ответ считался подтвержденным при положительном результате IgM и наличии высокоавидных IgG —  $\geq 5,0$  МЕ/мл [2, 11, 28, 37, 43, 44, 50].

Определение достоверности различий между показателями проводили методом Стьюдента и Фишера [1].

## Результаты

Согласно данным [7], заболеваемость корью за 2010–2016 гг. представляла собой кривую, начальная точка которой (2010 г.) характеризовала фазу элиминации инфекции с показателем менее 0,1 на 100 тыс. населения (рис. 1).

Однако в 2011 г. начался подъем заболеваемости (0,58 на 100 тыс. населения), который перерос в период высокой заболеваемости в последующие три года — 2012, 2013 и 2014, с показателями 1,5; 1,65; 3,24 на 100 тыс. населения соответственно. После трехлетнего периода высокой заболеваемости в 2015 г. число случаев кори начало снижаться, и в 2016 г. показатель составил 0,12 на 100 тыс. населения.

Анализ по возрастной заболеваемости 5539 лабораторно подтвержденных случаев кори в 2010–2016 гг. показал, что доля заболевших детей в возрасте от < 1 года до 14 лет составила 43,0% (2381/5539), подростков 15–17 лет — 3,4% (189/5539), а больных корью в возрасте 18–60 лет — 53,6% (2969/5539), при этом большая часть из них — 85,2% (2531/2969) — была представлена лицами возрастных групп 18–30 и 31–40 лет (рис. 2).

Минимальный процент случаев кори за весь период наблюдения был в 2 возрастных группах: подростки 15–17 лет и лица старше 50 лет — 3,4 и 1,7% соответственно.

Предварительный анализ заболеваемости больных разного возраста в годы высокой заболеваемости (2012, 2013, 2014) позволил объединить больных за этот период и провести сравнительный по возрастной анализ, используя обобщенные данные.

Основным критерием объединения данных, помимо высокой заболеваемости, явился практически одинаковый процент лиц вовлеченных в эпидемический процесс всех возрастных групп в эти годы, который колебался от 72,0 до 78,0% и в среднем составил  $(74,7 \pm 0,06)\%$ .

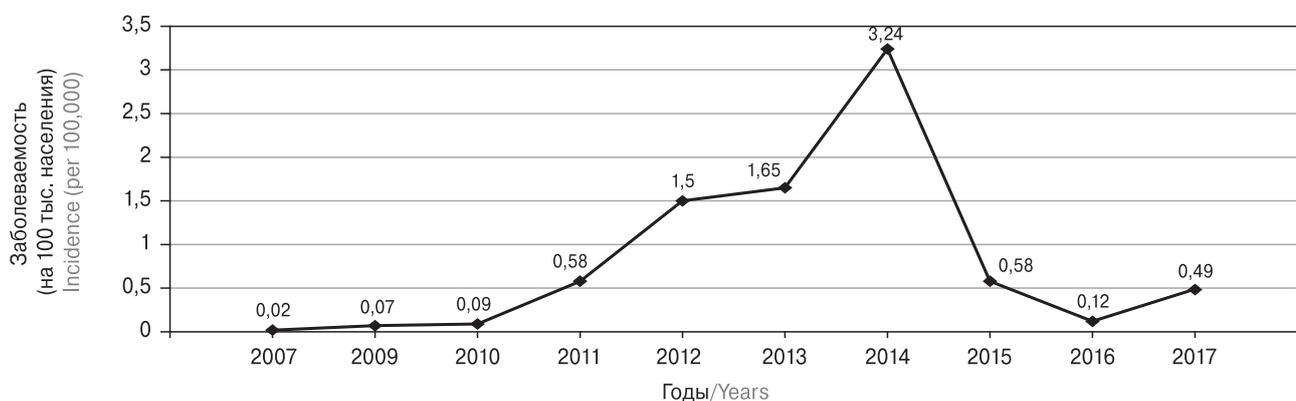
При анализе заболеваемости детей по годам установлено, что пациентов до 1 года в 2010 г. было 73,8% (31/42). Доля детей этой возрастной группы постепенно снизилась до 10,9% (11/101) в 2016 г. (рис. 3).

Процент больных детей возрастной группы 1–2 года с 7,1% (3/42) в 2010 г. увеличился до 41,4% (106/256) в 2011 г. ( $p < 0,001$ ). И далее, на протяжении всего срока наблюдения (2012–2016 гг.), доля заболевших этой возрастной группы практически не менялась  $(42,2 \pm 0,07)\%$ .

Пациентов возрастной группы 3–6 лет, у которых была подтверждена коревая инфекция, было 21,5% от общего числа больных корью детей в 2010–2016 гг. Доля заболевших этой возрастной группы по годам, за исключением 2010 г., когда корь была зарегистрирована только в одном случае, увеличивалась постепенно с 19,5% в 2011 г. до 32,6% в 2016 г. и в среднем составила  $(25,4 \pm 0,13)\%$  ( $p = 0,009$ ).

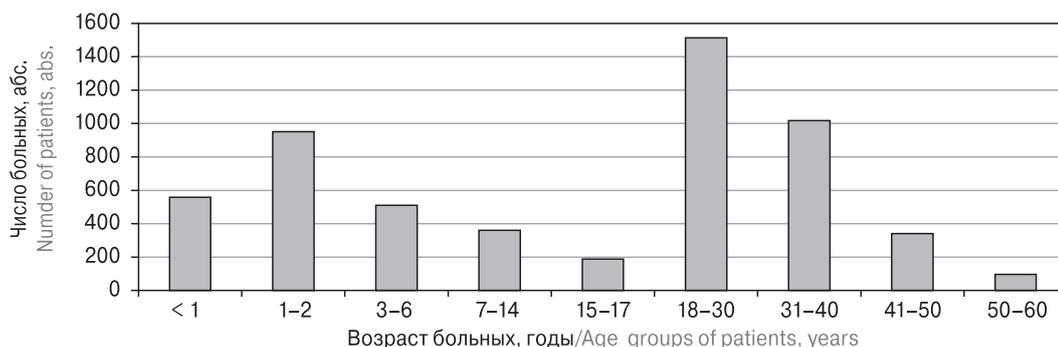
За весь период наблюдения больных корью детей в возрастной группе 7–14 лет было 15,1%. Участие заболевших этой возрастной группы в заболеваемости по годам было практически одинаковым  $(17,2 \pm 0,03)\%$ , за исключением 2011 г., когда этот показатель составил 4,3%.

Среди больных возрастной группы 15–60 лет доля подростков 15–17 лет составила 6,0%; в среднем по годам —  $(5,2 \pm 0,03)\%$  (рис. 4).



**Рисунок 1. Заболеваемость корью в России**

Figure 1. Measles incidence in Russia



**Рисунок 2. Возрастная структура больных корью в 2010–2016 гг.**

Figure 2. Age-related distribution of measles patients, 2010–2016

На протяжении всего периода наблюдения основную массу больных составляли лица 18–40 лет: от 93,3% в 2010 г. до 75,4% в 2016 г.; в среднем за эти годы показатель заболеваемости составил  $(82,0 \pm 0,18)\%$ . Увеличение доли заболевших корью в возрастной группе 41–50 лет было постепенным: с 3,3% (2/60) в 2010 г. до статистически значимого показателя — 15,9% (11/69) в 2016 г. ( $p = 0,018$ ).

Больных в возрасте 51–60 лет в 2010 г. выявлено не было. Процент пациентов в этой возрастной группе в 2011 г. составил 1,1% и далее варьировался на уровне 3,0–4,3% с 2012 по 2016 гг.

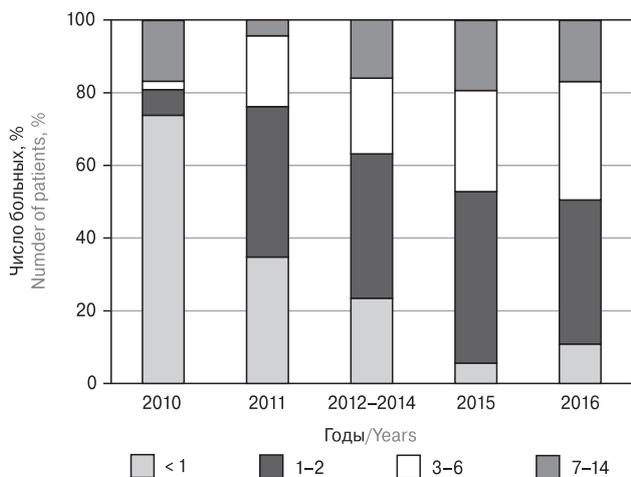
Таким образом, на протяжении всего периода наблюдения заболеваемость корью, в основном, поддерживалась:

- детьми 1–2 лет, процент которых составил 39,9 от общего числа заболевших детей в возрасте до 14 лет (951/2381);
- взрослыми 18–40 лет, доля которых составила 80,1% от общего числа заболевших подростков и взрослых 15–60 лет (2531/3158).

Низкий процент выявления больных корью среди пациентов 51–60 лет — 3,1% (97/3158) — связан, вероятно, с наличием в популяции лиц с постинфекционным иммунитетом [9].

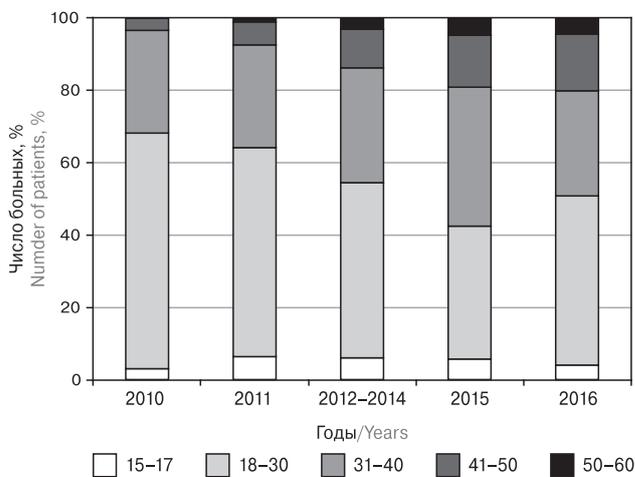
Сравнение данных подтверждающего тестирования сывороток на IgM, полученных на базе референс-лаборатории ЕРБ ВОЗ, МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского (Москва), и результатов первичного тестирования в лабораториях региональных центров по надзору за корью и краснухой показало сопоставимые результаты ( $R = 0,94$ ).

При тестировании 5539 сывороток больных корью для определения количественного содержания IgG было установлено, что 15,0% сывороток содержали коревые IgG в концентрации  $\geq 5,0$  МЕ/мл. При дополнительном разведении таких сывороток 1:400 (согласно инструкции на тест-систему) показатели специфических антител находились в диапазоне 8,5–45,0 МЕ/мл ( $21,4 \pm 0,36$ ). Выявленные в высокой концентрации IgG имели высокую степень avidности:



**Рисунок 3. Структура больных корью детей < 1 года — 14 лет в 2010–2016 гг.**

Figure 3. Age-groups distribution of children with measles < 1–14 years, 2010–2016



**Рисунок 4. Структура больных корью 15–60 лет в 2010–2016 гг.**

Figure 4. Age-groups distribution of measles patients aged 15–60 years, 2010–2016

80–100% ( $92,5 \pm 0,2$ ). В сыворотках остальных 85,0% пациентов коревые антитела имели низкую степень авидности ( $< 30\%$ ) с показателями концентрации в диапазоне 0,2–3,46 МЕ/мл ( $1,73 \pm 0,03$ ). В связи с этим лабораторные данные 4709 лиц были расценены как показатели первичного иммунного ответа, а результаты лабораторного обследования 830 пациентов как вторичный иммунный ответ у лиц с «вакцинными неудачами» [2, 11, 28, 37, 43, 44, 50] (рис. 5).

Анализ результатов обследования больных корью показал, что у детей до 14 лет формировался первичный иммунный ответ. Больных с вторичным иммунным ответом выявлено не было. Это может свидетельствовать о том, что привитые дети не вовлекаются в эпидемический процесс за счет наличия защитного уровня поствакцинального иммунитета к вирусу кори. Всего больных корью в возрасте 15–60 лет было 3158: из них с первичным иммунным ответом 73,7%, с вторичным — 26,3% (табл.).

Пациенты, ответившие на дикий вирус не только синтезом IgM, но и бустер-эффектом высокоавидных антител G класса, были зарегистрированы среди подростков 15–17 лет — 3,3% и взрослых 18–60 лет — 96,7%. За период наблюдения лидирующую позицию по наличию вторичного иммунного ответа из общего числа лиц с «вакцинными неудачами» занимала возрастная группа 18–30 лет — 47,5%. В возрастных группах 31–40, 41–50 и 51–60 лет больных с вторичным иммунным ответом было 38,1; 9,3 и 1,9% соответственно. Снижение процента больных с первичным иммунным ответом в зависимости от возраста заболевших происходило аналогично: 18–30 лет — 48,1%; 31–40 лет — 30,2%; 41–50 лет — 11,3%; 51–60 лет — 3,5%. Заболеваемость лиц как с первичным, так и с вторичным иммунным ответом снижалась в зависимости от возраста заболевшего, веро-

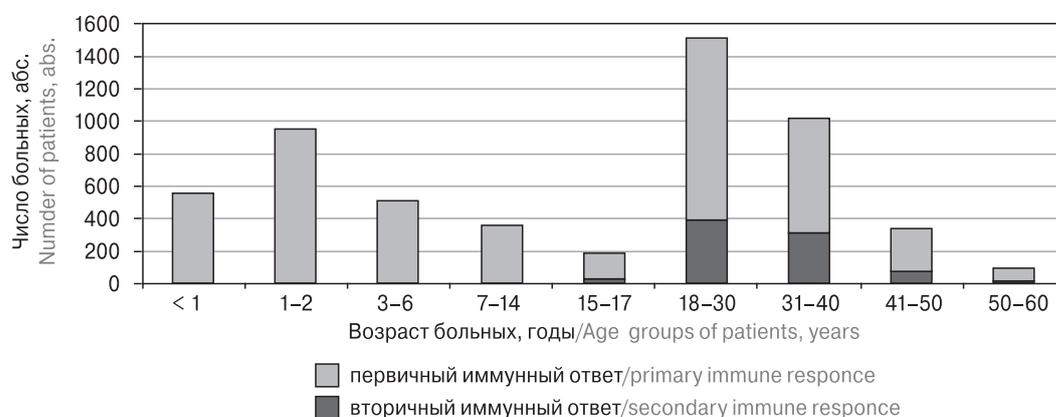
ятно, за счет взрослого населения с противокоревым постинфекционным иммунитетом в популяции.

Кроме того, результаты обследования подростков и взрослых 15–60 лет в 2010–2016 гг. показали, что подъем заболеваемости был связан не только с количественными показателями антител G класса у больных, но и с расширением возрастного контингента, вовлекаемого в эпидемический процесс (табл.). Так, в 2010 г., когда процент заболевших подростков и взрослых составил 58,8%, практически не было больных в возрастных группах 15–17, 41–50 и 51–60 лет, а заболеваемость обеспечивалась пациентами 18–30 лет — 65,0% и 31–40 лет — 28,4%. При этом больных с «вакцинными неудачами» в 2010 г. среди подростков и взрослых было в 1,5 раза больше, чем лиц с первичным иммунным ответом.

Анализ результатов обследования 5539 больных с первичным и вторичным иммунным ответом на протяжении 2010–2016 гг., в период с разной эпидемической ситуацией, показал, что пациентов с «вакцинными неудачами» в год относительного благополучия (2010), когда заболеваемость составляла 0,09 на 100 тыс. населения, было статистически больше по сравнению с 2014 г. — периодом высокой заболеваемости (3,24 на 100 тыс. населения): 35,3% против 9,9% ( $p < 0,001$ ) (рис. 6).

Та же тенденция, при которой число пациентов с вторичным иммунным ответом статистически больше по сравнению с 2014 г., была и в 2016 г. при показателе заболеваемости 0,12 на 100 тыс. населения: 18,2% против 9,9% ( $p = 0,002$ ).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об активном участии в эпидемическом процессе не только больных с первичным иммунным ответом, но и лиц, результатом



**Рисунок 5. Возрастная структура больных корью в 2010–2016 гг. с первичным и вторичным иммунным ответом**

Figure 5. Age-related distribution of measles patients, 2010–2016 with primary and secondary immune response

встречи с диким вирусом кори для которых явилось заболевание с вторичным иммунным ответом. Выявление больных с «вакцинными неудачами» в периоды относительного эпидемического благополучия (2010 г., 2016 г.), по сравнению с периодом высокой заболеваемости (2014 г.) в большем проценте, 35,3 и 18,2 против 9,9 соответственно, может свидетельствовать о циркуляции вируса в популяции за счет лиц с вторичным иммунным ответом.

## Обсуждение

Противоречивость данных о высоком охвате плановой иммунизацией, с одной стороны, и рекордным числом больных корью на местном уровне, с другой, ставит перед мировым сообществом ряд вопросов, от решения которых зависит выполнение глобальной программы элиминации кори в целом [21, 35]. Свидетельствуют ли случаи кори, возникшие из-за несоблюдения графиков вакцинации и недостаточного количества полученных доз вакцины, о несостоятельности программы иммунизации или причиной этого является несовершенство самой вакцины? Эти и другие вопросы широко обсуждаются в литературе [20, 21, 31, 36, 54]. Одни авторы поднимают вопросы о необходимости смены вакцинного штамма, использовании нескольких генотипов вируса кори для приготовления вакцин нового поколения, введении 3 и более доз вакцинного препарата [31, 36], другие свидетельствуют об отсутствии убедительных данных о неэффективности существующих вакцин, справедливо полагая, что не все потенциальные возможности существующей коревой вакцины используются программами иммунизации [20, 21].

В рамках наших исследований, которые проводились с использованием лабораторных методов на протяжении семилетнего периода (2010–2016), характеризующегося разной эпидемической ситуацией, в сыворотках крови 5539 больных с клинически и лабораторно подтвержденной корью в возрасте от менее 1 года до 60 лет был определен тип иммунного ответа (первичный или вторичный) и проведена по-возрастная оценка полученных данных.

Анализ результатов исследования образцов сывороток крови больных корью в 2010–2016 гг. показал, что процент пациентов с первичным иммунным ответом составил 64,7% (66/102) в 2010 г. (показатель заболеваемости 0,09 на 100 тыс. населения), 90,1% (1144/1270) в 2014 г. (показатель заболеваемости 3,24 на 100 тыс. населения) и 81,8% (139/170) в 2016 г. (рис. 6). Для классификации случаев кори была применена модифицированная методика, предложенная Patel М.К. и соавт. [42], которую авторы

**Таблица. Структура больных корью 15–60 лет с первичным и вторичным иммунным ответом**

Table. Age-related structure of measles patients 15–60 years old with primary and secondary immune response

Год Year	Всего больных Total number of patients	15–17		18–30		31–40		41–50		51–60	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
2010	60	2	3,3	15	25,0	7	11,7	10	16,7	2	3,3
2011	273	18	6,6	110	40,3	46	16,8	32	11,7	7	2,6
2012	649	43	6,6	202	31,1	114	17,6	96	14,8	25	3,8
2013	934	39	4,2	382	40,9	220	23,6	63	6,7	16	1,7
2014	780	36	4,6	287	36,8	210	26,9	49	6,3	12	1,5
2015	393	21	5,3	112	28,5	94	23,9	57	14,5	14	3,6
2016	69	3	4,3	11	16,0	11	16,0	9	13,0	1	1,5
Всего	3158	162	5,1	1119	35,4	702	22,2	316	10,0	77	2,4

**Примечания:** \* — первичный иммунный ответ; \*\* — вторичный иммунный ответ; абс. — абсолютное количество больных с первичным и вторичным иммунным ответом; % — процент от общего числа обследованных каждого года.

Note: \* — primary immune response; \*\* — secondary immune response; abs. — absolute number of patients with primary and secondary immune response; % — percentage in relation to the total number of patients in each year.

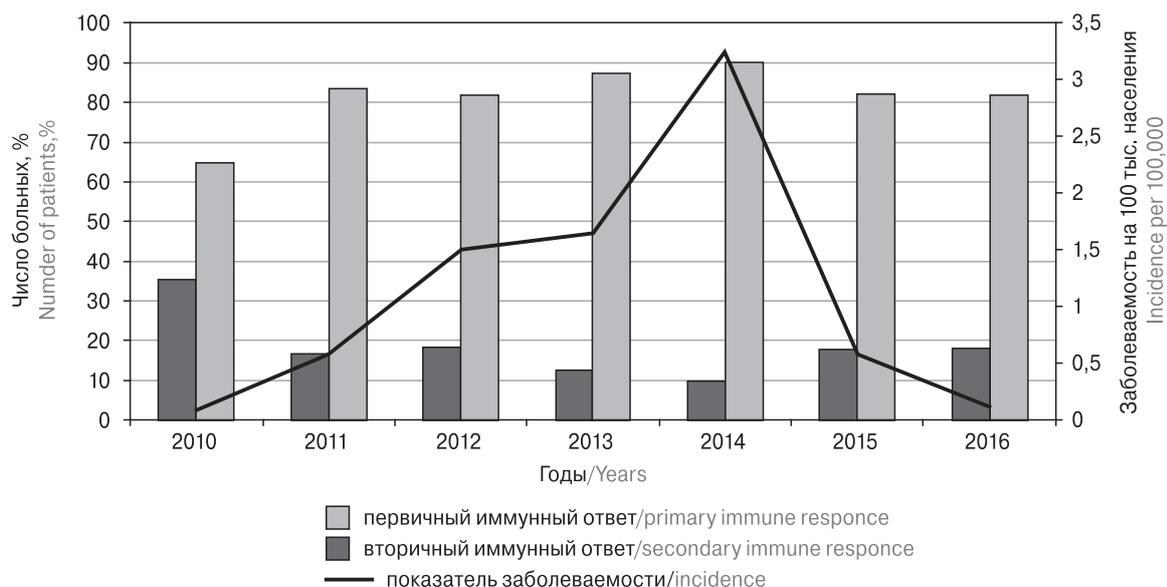
использовали при глобальном распределении заболевших корью. Для разделения больных на группы нами были использованы два основных критерия: возраст больного и тип иммунного ответа (первичный или вторичный). Исходя из этого, все больные были разделены на три группы:

- 1 группа — больные, не привитые по возрасту — 559 детей (10,1%) в возрасте до 1 года, заболевание корью у которых протекало по первичному типу иммунного ответа;
- 2 группа — 4150 (74,9%) больных в возрасте 1–60 лет, коревая инфекция у которых сопровождалась первичным иммунным ответом; согласно прививочному календарю и возрасту, эти больные должны были получить одну или две дозы вакцины;
- 3 группа — больные с «вакцинными неудачами» — 830 (15,0%) в возрасте 15–60 лет, которые при заболевании ответили вторичным иммунным ответом, свидетельствующим о повторной встрече организма с вирусом кори. Пациенты этой группы, вероятно, были вакцинированы ранее, однако по причинам первичных или вторичных неудач не выработали достаточного уровня специфической защиты от вируса.

При анализе полученных данных установлено, что 74,9% (4150/5539) случаев кори (группа 2) можно было предотвратить с помощью программы вакцинопрофилактики. При этом на протяжении всех лет наблюдения основную массу заболевших второй группы с первичным ответом составляли больные 18–40 лет (рис. 2, 4). Доля этих больных в среднем оценивалась

в  $(82,0 \pm 0,18)\%$ , с колебаниями от 93,3% в 2010 г. до 75,4% в 2016 г. Отсутствие противокорьевого иммунитета у лиц этой возрастной группы населения, не только самой мобильной и активной, но и детородной, может способствовать распространению вируса кори, а также высокой заболеваемости детей первого года жизни, которая возникает часто как внутрибольничная инфекция [7, 12]. Пациенты этой возрастной группы (< 1 года) составили 23,5% от числа всех заболевших детей в период наблюдения (559/2381) (рис. 2, 3). Больные с вторичным иммунным ответом (группа 3) в 2010–2016 гг. были выявлены в 15,0% случаев. Из них подростки 15–17 лет составили 3,3%, больные в возрасте 51–60 лет — 1,9%, а пациенты 18–50 лет — 94,8% (рис. 5). При этом доля больных с «вакцинными неудачами» снижалась с возрастом пациентов: с 47,5% (394/830) в возрастной группе 18–30 лет до 9,3% (77/830) среди больных 41–50 лет, что, вероятно, связано с увеличением числа лиц, имеющих защитный уровень постинфекционных специфических антител (рис. 5, табл. 1).

Несмотря на общую малочисленность больных с «вакцинными неудачами» — 15,0%, наибольшее внимание привлекают периоды низкой заболеваемости: 2010 и 2016 гг. с показателями 0,09 и 0,12 на 100 тыс. населения соответственно. Именно в эти годы выявлено наибольшее число пациентов с вторичным иммунным ответом: 35,3 и 18,2% соответственно, по сравнению с 2014 г., при регистрации высокой (3,24 на 100 тыс. населения) заболеваемости корью, когда доля таких больных составила 9,9% (рис. 6). В связи с этим особое внимание



**Рисунок 6. Структура больных с первичным и вторичным иммунным ответом по годам от общего числа больных за 2010–2016 гг.**

Figure 6. Structure of measles patients with primary and secondary immune response in relation to the total number of patients in 2010–2016

в эти периоды должно быть уделено программе активного поиска случаев коревой инфекции [6]. Клинические проявления заболевания корью у привитых могут быть стертыми и атипичными, и не все пациенты обращаются за медицинской помощью. Это свидетельствует о существовании объективных причин, которые приводят, с одной стороны, к недооценке фактической заболеваемости, а с другой — к распространению инфекции, так как остаются так называемые «лазейки» для циркуляции вируса в популяции за счет больных с вторичным типом иммунного ответа [3, 32, 40].

И хотя значительной движущей силой заболеваемости корью несомненно являются невакцинированные лица, а большое число вакцинированных считаются защищенными людьми, появление симптомов коревой инфекции у части ранее привитых вызывает беспокойство, поскольку они, как и все больные корью, контагиозны для непривитых, число которых увеличивается в связи с существующей антипрививочной кампанией. Во время недавних вспышек кори в отдельных странах по всему миру вторичные сбои были официально зарегистрированы на достаточно значимом уровне. В Японии в 2017 г. во время вспышки кори, вызванной импортированными случаями, 26% случаев были расценены как «вакцинные неудачи» [32]; в Нидерландах «вакцинные неудачи» были задокументированы в 16% [27]; в Микронезии (как стало известно, возможно, из-за проблем «холодовой цепи») было зарегистрировано 40% больных корью с вторичным иммунным ответом [14]. Глобальная классификация случаев кори за период 2013–2017 гг. показала, что 9% заболевших во всем мире получили две дозы вакцины [42]. Вспышки кори наглядно демонстрируют существующие «пробелы» в иммунитете населения и представляют угрозу для элиминации кори в целом. И как показали наши данные, свидетельствующие о вовлечении возрастных групп в возрастающий эпидемический процесс (таб.), а также результаты исследований других авторов [20, 21], вирус кори обладает уникальным потенциалом распространения и заражения недостаточно защищенных групп населения.

Результаты наших исследований, полученные с использованием новых стандартов для лабораторного подтверждения коревой инфекции, предложенных ВОЗ [34, 53], свидетельствуют о наличии «пробелов» в организации программы иммунизации против кори и необходимости принятия мер по ее оптимизации. Тем более что эффективные инструменты для достижения цели элиминации кори — вакцины — доступны. И, несмотря на то что некоторые авторы высказывают мнение о необходимости замены

вакцинного препарата, пока нет убедительных данных о неэффективности вакцины против кори [20, 21]. Следует особое внимание обращать на вовлеченных во вспышку кори «участников», не забывая и о самом вирусе кори, его способности находить ошибки в программе вакцинации. Изучение поствакцинального и постинфекционного иммунитета, защитного уровня специфических антител, а также иммуностимулирующих свойств вируса кори как способа поддержания пожизненного иммунитета, по мнению некоторых авторов, является одной из важных задач на этапе достижения цели элиминации кори [8, 10, 13, 15, 25, 26, 30, 47, 55].

Необходимо также учитывать, что существующие способы и средства для выявления «пробелов» в иммунитете, такие как запись о регулярном охвате иммунизацией, часто неадекватны, а серомониторинг представляет собой чрезвычайно ресурсоемкую процедуру, сложную с точки зрения логистики и интерпретации [20].

Таким образом, совершенствование программы вакцинопрофилактики на основе ретроспективного анализа возрастной структуры вовлеченных в эпидемический процесс лиц, определение типа иммунного ответа и характеристики используемых в указанный период исследования вакцин являются важными составляющими успешного достижения искомой цели элиминации кори в мировом масштабе.

## Выводы

1. Установлено, что заболеваемость корью лиц разного возраста (< 1 года — 60 лет) на протяжении всего периода наблюдения (2010–2016 гг.) в основном поддерживалась детьми 1–2 лет — 39,9% от общего числа заболевших корью детей (< 1–14 лет) и взрослыми 18–40 лет — 80,1% от общего числа больных 15–60 лет.
2. Согласно новым стандартам ВОЗ по лабораторному подтверждению кори с помощью тестов для определения IgM, количественных и качественных (степень avidности) показателей IgG, были получены результаты, которые позволили дифференцировать первичный и вторичный иммунный ответ на коревую инфекцию.
3. У всех заболевших детей до 14 лет при встрече с вирусом кори формировался первичный иммунный ответ. Случаев с «вакцинными неудачами» выявлено не было, что свидетельствует об эффективности вакцинации против кори детского населения.
4. Установлено, что у больных корью лиц в возрасте 15–60 лет, заболевание у которых можно было предотвратить своевременной вакцинацией, первичный иммунный ответ был зафиксирован у 73,7%; лиц с «вакцинными неудачами» было — 26,3%: среди подростков 15–17 лет

составил 3,3%, больных в возрасте 51–60 лет — 1,9% и 18–50 лет — 94,8%.

5. Показано, что в 2010 и 2016 гг., периодах с низкой заболеваемостью корью (показатель заболеваемости 0,09 и 0,12 на 100 тыс. населения соответственно), по сравнению с 2014 гг., когда заболеваемость была высокой (3,24 на 100 тыс. населения), больных с вторичным иммунным ответом было больше: 35,3% и 18,2% против 9,9% ( $p < 0,05$ ), что может свидетельствовать об их активном участии в эпидемическом процессе и передаче вируса восприимчивому контингенту.

## Благодарности

Коллектив авторов выражает глубокую благодарность сотрудникам вирусологических лабораторий Московского, Санкт-Петербургского, Нижегородского, Ростовского, Пермского, Новосибирского, Красноярского, Амурского, Приморского и Республики Башкортостан региональных центров по надзору за корью и краснухой в России за помощь в обеспечении материалами для исследований и проведении первичного тестирования клинических образцов.

## Список литературы/References

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. М.: Медицина, 1962. 182 с. [Ashmarin I.P., Vorobyov A.A. Statistical methods in microbiological studies. Moscow: Medicina, 1962. 182 p. (In Russ.)]
2. Мамаева Т.А., Железнова Н.В., Наумова М.А., Говорухина М.В., Калашникова Н.А., Бичурина М.А., Мукомолов С.Л. Алгоритм лабораторного подтверждения и дифференциальной диагностики коревой инфекции в период элиминации кори в Российской Федерации // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 1. С. 55–62. [Mamaeva T.A., Zheleznova N.V., Naumova M.A., Govorukhina M.V., Kalashnikova N.A., Bichurina M.A., Mukomolov S.L. Algorithm for laboratory confirmation and differential diagnosis of measles infection during measles elimination in the Russian Federation. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2015, vol. 5, no. 1, pp. 55–62. doi: 10.15789/2220-7619-2015-1-55-62 (In Russ.)]
3. Мамаева Т.А., Липская Г.Ю., Наумова М.А., Шульга С.В., Mulders M., Featherstone D.A., Завьялова Л.А., Чернышова Е.В., Замятина Е.П., Кузнецова Н.Н. Особенности лабораторной диагностики кори у больных с разным прививочным анамнезом // Вопросы вирусологии. 2012. № 5. С. 21–26. [Mamaeva T.A., Lipskaya G.Y., Naumova M.A., Shulga S.V., Mulders M., Featherstone D.A., Zavyalova L.A., Chernyshova E.V., Zamyatina E.P., Kuznetsova N.N. Peculiarity of the laboratory diagnostic of the measles virus infection in previously vaccinated and unvaccinated patients. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2012, no. 5, pp. 21–26. (In Russ.)]
4. Мамаева Т.А., Наумова М.А., Железнова Н.В., Липская Г.Ю., Mulders M., Featherstone D.A. Оценка коммерческих тест-систем ИФА разного формата для определения уровня специфических IgM и IgG в сыворотках больных корью // Вопросы вирусологии. 2013. № 5. С. 43–48. [Mamaeva T.A., Naumova M.A., Zheleznova N.V., Lipskaya G.Y., Mulders M., Featherstone D.A. The estimation of the commercial ELISA test-systems of different format to detect specific IgM and IgG in measles patients' sera. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2013, no. 5, pp. 43–48. (In Russ.)]
5. Мамаева Т.А., Тихонова Н.Т., Наумова М.А., Шульга С.В. Национальная лабораторная сеть Российской Федерации по диагностике кори и ее роль в выполнении программы ВОЗ по ликвидации кори // Здоровье населения и среда обитания. 2007. № 11 (176). С. 4–7. [Mamaeva T.A., Tikhonova N.T., Naumova M.A., Shulga S.V. National laboratory network of the Russian Federation for the diagnosis of measles and its role in the implementation of the WHO program to eliminate measles. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya = Human Health and The Environment Inhabitation*, 2007, no. 11 (176), pp. 4–7. (In Russ.)]
6. Об обследовании больных с экзантемой и лихорадкой в рамках реализации Программы ликвидации кори. Приказ Роспотребнадзора № 33 от 05.02.2010. [Examination of patients with exanthema and fever as part of the measles protection program. Order of Rospotrebnadzor No. 33, 05.02.2010]. URL: <http://docs.cntd.ru/document/902201050>
7. Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Алешкин В.А. Корь в России: проблемы ликвидации. М.: Династия, 2017. 552 с. [Onishchenko G.G., Popova A.Yu., Aleshkin V.A. Measles in Russia: problems of elimination. Moscow: Dinastiya, 2017. 552 p. (In Russ.)]
8. Смердова М.А., Топтыгина А.П., Андреев Ю.Ю., Сенников С.В., Зеткин А.Ю., Клыкова Т.Г., Беляков С.И. Гуморальный и клеточный иммунитет к антигенам вируса кори и краснухи у здоровых людей // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 3–4. С. 607–611. [Smerdova M.A., Toptygina A.P., Andreev Y.Y., Sennikova S.V., Zetkin A.Y., Klykova T.G., Belyakov S.I. Humoral and cellular immunity to measles and rubella virus antigens in healthy subjects. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2019, vol. 9, no. 3–4, pp. 607–611. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-607-611 (In Russ.)]
9. Тихонова Н.Т., Мамаева Т.А., Шульга С.В., Ежлова Е.Б., Лыткина И.Н., Цвиркун О.В., Герасимова А.Г. Лабораторное обеспечение Программы ликвидации эндемичной кори в Российской Федерации // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2011. № 1. С. 36–39. [Tikhonova N.T., Mamaeva T.A., Shul'ga S.V., Ezhlova E.B., Lytkina I.N., Tsvirkun O.V., Gerasimova A.G. Laboratory support of the Program Elimination of endemic measles in the Russian Federation. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2011, no. 1, pp. 36–39. (In Russ.)]
10. Топтыгина А.П., Мамаева Т.А., Алешкин В.А. Особенности специфического гуморального иммунного ответа против вируса кори // Инфекция и иммунитет. 2013. № 3. С. 243–250. [Toptygina A.P., Mamaeva T.A., Alyoshkin V.A. Features of the specific humoral immune response against measles virus. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2013, no. 3, pp. 243–250. doi: 10.15789/2220-7619-2013-3-243-250 (In Russ.)]
11. 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.)]

12. Цвиркун О.В., Герасимова А.Г., Тихонова Н.Т., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Дубовицкая Е.Л., Орлова О.С., Басов А.А., Фролов Р.А. Заболеваемость корью в разных возрастных группах в период элиминации инфекции // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2017. № 3 (94). С. 18–25. [Tsvirkun O.V., Gerasimova A.G., Tikhonova N.T., Ezlova E.B., Melnikova A.A., Dubovitskaya E.L., Orlova O.S., Basov A.A., Frolov R.A. Measles cases by age group during the elimination of infection. *Epidemiologiya i vaksinosprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2017, no. 3 (94), pp. 18–25. doi: 10.31.631/2073-3046-2017-16-3-1825 (In Russ.)]
13. Atrasheuskaya A.V., Kulak M.V., Neverov A.A., Rubin S.A., Ignatyev G.M. Measles cases in highly vaccinated population of Novosibirsk, Russia, 2000–2005. *Vaccine*, 2008, vol. 26, pp. 2111–2118. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.02.028
14. Breackwell L., Moturi E., Helgenberger L., Gopalani S.V., Hales G., Lam E., Sharapov U., Larzeller M., Johnson E., Masao C., Setik E., Barrow L., Dolan S., Chen T.H., Patel M., Rota P., Hickman C., Bellini W., Seward J., Wallace G., Papania M. Measles outbreak associated with vaccine failure in adults — Federated States of Micronesia February–August 2014. *Morb. Mortal. Wkly Rep.*, 2015, vol. 64, pp. 1088–1092.
15. Chen R.T., Markowitz L.E., Albrecht P., Stewart J.A., Mofenson L.M., Preblud S.R., Orenstein W.A. Measles antibody: reevaluation of protective titers. *J. Infect. Dis.*, 1990, vol. 162 (5), pp. 1036–1042. doi:10.1093/infdis/162.5.1036
16. Cherry J.D., Zahn M. Clinical characteristics of measles in previously vaccinated and unvaccinated patients in California. *Clin. Infect. Dis.*, 2018, vol. 67, pp. 1315–1319. doi: 10.1093/cid/ciy286
17. Christenson B., Botting M. Measles antibody: comparison of long-term vaccination titres, early vaccination titres and naturally acquired immunity to and booster effects on the measles virus. *Vaccine*, 1994, vol. 12, no. 2, pp. 129–133. doi: 10.1016/0264-410X(94)90049-3
18. Davidkin I., Jokinen S., Broman M., Leinkki P., Peltola H. Persistence of measles, mumps, and rubella antibodies in an MMR-vaccinated cohort: a 20-years follow-up. *J. Infect. Dis.*, 2008, vol. 197 (7), pp. 950–956. doi: 10.1086/528993
19. De Vries R.G., de Swart R.L., Lamouille B., Astier A., Rabourdin-Combe C. Measles immune suppression: functional impairment or numbers game? *PLoS Pathog.*, 2014, vol. 10, no. 12: e1004482. doi: 10.1371/journal.ppat.1004482
20. Durrhem D.N. Measles virus is unforgiving where immunity gaps exist. *J. Infect. Dis.*, 2017, vol. 216 (10), pp. 1183–1184. doi: 10.1093/infdis/jix452
21. Durrhem D.N., Crowcroft N.S. The price of delaying measles eradication. *The Lancet Public Health*, 2017, vol. 2 (3), pp. e130–e131. doi: 10.1016/S2468-2667(17)30026-9
22. Eaton L. Measles cases in England and Wales rise sharply in 2008. *BMJ*, 2009, vol. 338, p. b533.
23. Enders J.F., Peebles T.C. Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1954, vol. 86, no. 2, pp. 277–286. doi: 10.3181/00379727-86-21073
24. Funk S., Knapp J.K., Lebo E., Reef S.E., Dabbagh A., Kretsinger K., Jit M., Edmunds W.J., Strebel P.M. Combining serological and contact data to derive target immunity levels for achieving and maintaining measles elimination. *BMC Med.*, 2019, vol. 17, no. 1: 180. doi: 10.1186/s12916-019-1413-7
25. Griffin D.E. The immune response in measles: virus control, clearance and protective immunity. *Viruses*, 2016, vol. 8, no. 10: 282. doi: 10.3390/V8100282
26. Griffin D.E., Lin W.H., Pan C.H. Measles virus, immune control and persistence. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2012, vol. 36, no. 3, pp. 649–662. doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00330.x
27. Hahne S.J.M., Nic Lochlainn L.M., van Bugel N.D. Measles outbreak among previously immunized helthcae works, The Netherlands, 2014. *J. Infect. Dis.*, 2016, vol. 214, no. 12, pp. 1980–1986. doi: 10.1093/infdis/jiw480
28. Hickman C.J., Hyde T.B., Sovers S.B., Mercader S., McGrew M., Williams N.J., Beeler J.A., Audet S., Kiehl B., Nandy R., Tamin A., Bellini W.J. Laboratory characterization of measles virus infection in previously vaccinated and unvaccinated individuals. *J. Infect. Dis.*, 2011, vol. 204, no. 1, pp. 549–558. doi: 10.1093/infdis/jir106
29. Hubschen J.M., Bork S.M., Brown K.E., Mankertz A., Santibanez S., Ben Mamou M., Mulders M.N., Muller C.P. Challenges of measles and rubella laboratory diagnostic in the era of elimination. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2017, vol. 23, no. 8, pp. 511–515. doi: 10.1016/j.cmi.2017.04.009
30. Huiss S., Damien B., Schneider F., Muller C.P. Characteristics of asymptomatic secondary immune responses to MeV in late convalescent donors. *Clin. Exp. Immunol.*, 1997, vol. 109, no. 3, pp. 416–420. doi: 10.1046/j1365-2249.1997.00137.x
31. Javelle E., Colson P., Parola P., Raoult D. Measles, the need for a paradigm shift. *Eur. J. Epidemiol.*, 2019, vol. 34, no. 10, pp. 897–915. doi: 10.1007/S10654-019-00569-4
32. Komabayashi K., Seto J., Tanaka S., Suzuki Yu., Ikeda T., Onuki N., Yamada K., Ahiko T., Ishikawa H., Mizuta K. The largest measles outbreak, including 38 modified measles and 22 typical measles cases in its elimination Era in Yamagata, Japan. 2017. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 2018, vol. 71, pp. 413–418. doi: 10.7883/yoken.JJID.2018.083
33. Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection; 2<sup>nd</sup> ed. Geneva, Switzerland: WHO, 2006.
34. Manual for the laboratory-based surveillance of measles, rubella, and congenital rubella syndrome; 3<sup>rd</sup> ed. Geneva, Switzerland: WHO, 2018.
35. Measles in Europe: record number of both sick and immunized. WHO Europe, Copenhagen, 7 February 2019. URL: <https://www.euro.who.int/en/media-centre/sections/press-releases/2019/measles-in-europe-record-number-of-both-sick-and-immunized>
36. McKee A., Ferrari M.J., Shea K. Correlation between measles vaccine doses: implications for the maintenance of elimination. *Epidemiol. Infect.*, 2018, vol. 146, pp. 468–475. doi: 10.1017/S950268817003077
37. Mercades S., Garcia P., Bellini W.J. Measles virus IgG avidity assay for use in classification of measles vaccine failure in measles elimination setting. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2012, vol. 19, no. 11, pp. 1810–1817. doi: 10.1128/CVI.00406-12
38. Mina M.J. Measles, immune suppression and vaccination: direct and indirect nonspecific vaccine benefits. *J. Infect.*, 2017, vol. 74, pp. 10–17. doi: 10.1016/S0163-4453(17)30185-8
39. Mina M.J., Metcalf C.J.E., de Swart R.L., Osterhaus A.D.M.E., Grenfell B.T. Long-term measles-induced immunomodulation increases overall childhood infectious disease mortality. *Science*, 2015, vol. 348, no. 6235, pp. 694–699. doi: 10.1126/science.aaa3662. Epub 2015 8 may

40. Mitchell P., Turner N., Jennings L., Dong H. Previous vaccination modifies both the clinical disease and immunological features in children with measles. *J. Prim. Health Care*, 2013, vol. 5 (2), pp. 93–98.
41. Parent du Chatelet I., Floret D., Antona D., Levy-Bruhl D. Measles resurgence in France in 2008, a preliminary report. *Euro Surveill.*, 2009, vol. 14: 19118.
42. Patel M.K., Orenstein W.A. Classification of global measles cases in 2013–2017 as due to policy or vaccination failure: a retrospective review of global surveillance data. *Lancet Glob. Health*, 2019, vol. 7, pp. e313–e320. doi: 10.1016/S2214-109X(18)30492-3
43. Paunio M., Hedman K., Davidkin I., Peltola H. IgG avidity to distinguish secondary from primary measles vaccination failures: prospects for a more effective global measles elimination strategy. *Expert Opin. Pharmacother.*, 2003, vol. 4 (8), pp. 1215–1225. doi: 10.1517/14656566.4.8.1215
44. Paunio M., Hedman K., Davidkin I., Valle M., Heinonen O.P., Leinikki P., Salmi A., Peltola H. Secondary measles vaccine failures identified by measurement of IgG avidity: high occurrence among teenagers vaccinated at a young age. *Epidemiol. Infect.*, 2000, vol. 124, pp. 263–271. doi: 10.1517/S0950268899003222
45. Ramsay M., Brown K. The public health implication of secondary measles vaccine failure. *J. Prim. Health Care*, 2013, vol. 5 (2), pp. 92–94. doi:10.1071/HC13092
46. Ratnam S., Tipples G., Head C., Fauvel M., Fearon M., Ward B.J. Performance of indirect immunoglobulin M (IgM) serology test and IgM capture assays for laboratory diagnosis of measles. *J. Clin. Mic.*, 2000, no. 38, pp. 99–104.
47. Rosen J.B., Rota J.S., Hickman C.J., Sovers S.B., Mercader S., Rota P.A., Bellini W.J., Huang A.J., Doll M.K., Zucker J.R., Zimmerman C.M. Outbreak of measles among persons with prior evidence of immunity, New York City, 2011. *Clin. Infect. Dis.*, 2014, vol. 58 (9), pp. 1205–1210. doi: 10.1093/cid/ciu105
48. Rota J.S., Hickman C.J., Sovers S.B., Rota P.A., Mercader S., Bellini W.J. Two case studies of modified measles in vaccinated physicians exposed to primary measles case: high risk of infection but low risk of transmission. *J. Infect. Dis.*, 2011, vol. 204 (1), pp. 5559–5563.
49. Rota P.A., Moss W.J., Takeda M., de Swart R.L., Thompson K.M., Goodson J.L. Measles. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 2016, no. 2: 16049. doi: 10.1038/nrdp.2016.49
50. Sovers S.B., Rota J.S., Hickman C.J., Mercader S., Redd S., McNall R.J., Williams N., McGrew M., Walls M.L., Rota P.A., Bellini W.J. High concentration of measles neutralizing antibodies and high-avidity measles IgG accurately identify measles reinfection cases. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2016, vol. 23, no. 8, pp. 707–716. doi: 10.1128/CVI.00268-16
51. Sugeran D.E., Barsky A.E., Delea M.G., Ortega-Sanchez I.R., Bi D., Ralston K.G., Rota P.A., Waters-Montijo K., Lebaron C.W. Measles outbreak in a highly vaccinated population, San Diego, 2008: role internationally under vaccinated. *Pediatrics*, 2010, vol. 125, pp. 747–755.
52. Tahara M., Burchert J.-P., Maena K., Muller C.P., Taceda M. Measles virus hemagglutinin protein epitopes: the basis of antigenic stability. *Viruses*, 2016, vol. 8: 216. doi: 10.3390/V8080216
53. Vaccine Preventable Diseases Surveillance Standards, 2018. URL: [http://www.who.int/immunization/monitoring\\_surveillance/burden/vpd/standards/en](http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/standards/en)
54. Yang L., Grenfell B.T., Mina M.J. Measles vaccine immune escape: should we be concerned? *Eur. J. Epidemiol.*, 2019, vol. 34, pp. 893–896. doi: 10.1007/s10654-019-00574-7
55. Zhang Z., Chen M., Ma R., Pan J., Suo L., Lu L. Outbreak of measles among persons with secondary vaccine failure, China, 2018. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2020, vol. 16, no. 2, pp. 358–362. doi: 10.1080/21645515.2019.1653742

**Авторы:**

**Мамаева Т.А.**, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории прикладной иммунохимии ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;  
**Железнова Н.В.**, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории вирусных гепатитов ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;  
**Бичурина М.А.**, д.м.н., зав. вирусологической лабораторией Центра по элиминации кори и краснухи ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;  
**Наумова М.А.**, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории прикладной иммунохимии ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;  
**Говорухина М.В.**, к.м.н., зав. вирусологической лабораторией ФГУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;  
**Топтыгина А.П.**, д.м.н., руководитель лаборатории цитокинов ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия.

**Authors:**

**Mamaeva T.A.**, PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Immunochemistry, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;  
**Zheleznova N.V.**, PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Viral Hepatitis, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Bichurina M.A.**, PhD, MD (Medicine), Head of the Virological Laboratory of Measles and Rubella Elimination, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Naumova M.A.**, PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Immunochemistry, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;  
**Govoruhina M.V.**, PhD (Medicine), Head of the Laboratory of Virology, Center of Hygiene and Epidemiology, Rostov-on-Don, Russian Federation;  
**Toptygina A.P.**, PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory of Cytokine, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation.

# RISE IN 2017–2018 MEASLES MORBIDITY IN SERBIA AND NORTHWEST RUSSIA

V. Stoilkovic<sup>a</sup>, M.A. Bichurina<sup>b</sup>, I.N. Lavrentieva<sup>b</sup>, S. Filipovic-Vignjevic<sup>a</sup>, M. Bancevic<sup>a</sup>,  
N.V. Zheleznova<sup>b</sup>, A.Yu. Antipova<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Institute of Virology, Vaccine and Sera “Torlak”, Belgrade, Serbia

<sup>b</sup> St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** In 2017, the WHO registered 23,927 measles cases in 44 out of 53 countries in the European region. In 2018, measles incidence rate increased up to 82,599 cases registered in 48 countries of the region, with a large number of measles-associated deaths. Overall, 72 measles fatalities were registered in 10 European countries, including Serbia (15 cases). Aim of the study: to characterize 2017–2018 epidemiological upsurge of measles incidence rate observed in the Republic of Serbia (RS) and the Northwestern Federal District (NWFD) of the Russian Federation. *Materials and methods.* During the 2017–2018 season, 944 serum samples were collected from patients with measles, rubella, or exanthematous diseases in the NWFD and tested in the Laboratory of Virology at the St. Petersburg Regional Centre for Measles Surveillance (SPbRC). In 2017–2018, 2,946 serum samples from the Republic of Serbia were analyzed in the SPbRC by using ELISA with IgM measles test system (Vector-Best, Russia; or Siemens, Germany). Urine and swab samples were examined by RT-PCR and used for isolation and genotyping of measles viruses. *Results.* From 2017 to 2018, 5,798 measles cases were registered in the RS, among which 2,946 were laboratory-confirmed (serological testing and/or PCR). Unvaccinated subjects or those with unknown vaccination status accounted for majority of the cases. Children under 5 years of age and adults aged 30 years and over dominated among measles patients. During this season, 15 deaths were reported. Several genotypes of measles virus circulated in the RS, e.g. B3 Dublin, D8 Gir Somnath, and D8 Herborn. In 2018, 109 measles cases were recorded in the NWFD, 5 of which were imported from abroad. Among patients, adults comprised 64.2%, wherein 74.3% were covered by unvaccinated subjects or those with unknown vaccination status. Rise in measles incidence rate linked to multiple importations of various measles virus genotypes: B3 Kabul; B3 Dublin; D8 Frankfurt; D8 Cambridge; and D8 Gir Somnath.

**Key words:** incidence, measles, Serbia, Northwest Russia, vaccination, genotypes.

## ПОДЪЕМ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ КОРЬЮ В РЕСПУБЛИКЕ СЕРБИЯ И НА СЕВЕРО-ЗАПАДЕ РОССИИ В 2017–2018 ГОДАХ

Стоилькович В.<sup>1</sup>, Бичурина М.А.<sup>2</sup>, Лаврентьева И.Н.<sup>2</sup>, Филипович-Вигньевич С.<sup>1</sup>, Банчевич М.<sup>1</sup>,  
Железнова Н.В.<sup>2</sup>, Антипова А.Ю.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт вирусологии, вакцин и сывороток «Торлак», Белград, Сербия

<sup>2</sup> ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** В 2017 г. в Европейском регионе ВОЗ было зарегистрировано 23 927 случаев кори в 44 из 53 стран, а в 2018 г. заболеваемость корью возросла до 82 599 случаев, которые регистрировались в 48 странах региона. Впервые в 2018 г. имело место большое количество летальных случаев, обусловленных корью. Всего было

### 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:

Стоилькович В., Бичурина М.А., Лаврентьева И.Н., Филипович-Вигньевич С., Банчевич М., Железнова Н.В., Антипова А.Ю. Подъем заболеваемости корью в Республике Сербия и на Северо-Западе России в 2017–2018 годах // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 4. С. 729–734. doi: 10.15789/2220-7619-RIM-1342

### Citation:

Stoilkovic V., Bichurina M.A., Lavrentieva I.N., Filipovic-Vignjevic S., Bancevic M., Zheleznova N.V., Antipova A.Yu. Rise in 2017–2018 measles morbidity in Serbia and Northwest Russia // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 4, pp. 729–734. doi: 10.15789/2220-7619-RIM-1342

зарегистрировано 72 случая смерти от кори в десяти странах Европейского региона, включая Сербию (15 случаев). Цель исследования: характеристика эпидемиологического подъема заболеваемости корью в Республике Сербия (РС) и на территориях Северо-Западного федерального округа России (СЗФО) в 2017–2018 гг. *Материалы и методы.* Из Северо-Западного федерального округа в 2017–2018 гг. были исследованы 944 образца сыворотки крови от пациентов с корью, краснухой и экзантемными заболеваниями, доставленные в вирусологическую лабораторию Санкт-Петербургского регионального центра (РЦ). Из Республики Сербия в 2017–2018 гг. были исследованы 2946 образцов сывороток крови. Тестирование образцов сывороток крови проводили методом ИФА, с применением тест-систем IgM-корь фирмы «Вектор-Бест» (Россия) или «Siemens» (Германия). Образцы мочи и носоглоточных смывов исследовались методом RT-PCR и использовались для выделения и генотипирования вирусов кори. *Результаты.* В Республике Сербия в 2017–2018 г. было зарегистрировано 5798 случаев кори. Лабораторно диагноз подтвержден (серологически и/ или ПЦР) у 2946 пациентов. Болели в основном невакцинированные лица и лица с неизвестным вакцинным статусом. Большинство заболевших были дети моложе пяти лет и взрослые в возрасте 30 лет и старше. В течение этого периода было зарегистрировано 15 летальных случаев. В 2017–2018 гг. в Республике Сербия циркулировали несколько генотипов вируса кори: B3 Dublin, D8 Gir Somnath и D8 Herborn. В Северо-Западном федеральном округе России в 2018 г. было зарегистрировано 109 случаев кори, пять из которых были импортированы из других стран. Среди заболевших лиц 64,2% составляли взрослые. В 74,3% случаев болели невакцинированные или лица с неизвестным вакцинным статусом. Повышение заболеваемости корью в СЗФО была связана с многократным импортом различных генотипов вируса кори: B3 Kabul, B3 Dublin, D8 Frankfurt, D8 Cambridge and D8 Gir Somnath.

**Ключевые слова:** заболеваемость, корь, Сербия, Северо-Запад России, вакцинация, генотипы.

## Introduction

In 2002, the WHO Regional Office for Europe developed a Strategic Plan for the elimination of measles, rubella, and congenital rubella by the end of 2010 [20]. Later, due to increases in measles incidence, the plan's implementation target was postponed until the year 2015 and yet again until the year 2020 [13, 22]. In 2017, 23,927 cases were registered in 44 out of 53 countries in the WHO European region. In 2018, measles incidence increased to 82,599 cases and was registered in 48 countries of the region [8, 14]. The most affected countries were Ukraine (53,218 cases, a rate of 1,209.2 per million population); Serbia (5,076 cases, a rate of 579.3); Georgia (2,203 cases, a rate of 563.8); and Israel (2,919 cases, a rate of 345.3). In 2018, five WHO European region countries accounted for 81% of the region's reported measles cases; these were Ukraine, Serbia, Israel, France, and Italy [6, 9, 16, 24]. The measles virus was absent in only five regional countries. A large number of fatal measles cases took place for the first time in 2018. Specifically, 72 deaths from measles were recorded in 10 European region countries. The largest numbers of deaths were reported in Romania (22); Ukraine (15); and Serbia (15). Among the sick, 47% were unvaccinated, and 26% were of unknown vaccination status. The most affected were persons aged 20 years and over. In 2019, registration of a larger number of measles cases continued in the WHO European region. Cases were registered in Romania (1,533); France (1,453); Poland (1,044); Bulgaria (866); and Italy (864). Seven fatalities occurred: 5 in Romania; 1 in Italy; and 1 in France [11].

In the Russian Federation, the 'National Program for Elimination of Measles, Rubella, and Congenital Rubella By The Year 2010' was developed in 2002.

From 2008 to 2010 in Russia, measles incidence was kept at a very low level and cases mainly arose from importation of measles virus (of various genotypes) from endemic regions of the world [2, 3, 4]. The Northwestern Russian Region (NRR) is comprised of 11 areas monitored by the St. Petersburg Regional Centre for Measles Surveillance (SPbRC). From 2008 to 2011, sporadic, individual measles cases were registered in the NRR. In 2012, however, an increase in measles incidence took place in the NRR in connection with a measles outbreak in a children's hospital in St. Petersburg [1]. The goal of WHO-supported epidemiological and laboratory surveillance of measles and rubella in the Republic of Serbia is elimination of endemic measles and rubella; and prevention of congenital rubella infection (CRI) in the European Region [20]. Unfortunately, based on conclusions reached at the 8<sup>th</sup> meeting of the European Regional Verification Commission for Measles and Rubella Elimination (RVC, 12–14 June 2019, Warsaw), Serbia remains a measles and rubella endemic country. The World Health Organization (WHO) has targeted measles for elimination by 2020, and the goal does not currently appear to be feasible [13, 22].

Surveillance of measles and rubella in Serbia (population of about 7 million) is conducted by "Dr. Milan Jovanović Batut" Institute of Public Health of Serbia and the National Reference Laboratory for Measles and Rubella (NRL) (of the Torlak Institute of Virology, Vaccine and Sera). Surveillance, based on the WHO measles case definition, was implemented in 2009 and relies on 22 Institutes of Public Health (IPH), the National Reference Laboratory for measles, and healthcare workers (HCWs) at all levels. The epidemiological data analyzed herein originated from public data (regarding the actual epi-

demiological measles situation in Serbia) provided by the “Dr. Milan Jovanović Batut” Institute of Public Health of Serbia (Belgrade); and from the laboratory database of the National Reference Laboratory for Measles and Rubella. Joint efforts (National Verification Commission, National Reference Laboratory for Measles and Rubella) to eliminate (and maintain elimination) of measles and rubella focus on confirming the absence of transmission of wild measles/rubella viruses in the population or region over defined time periods.

Aim of the study is to characterize increases in measles incidence seen in Serbia and Northwestern Russia from 2017 to 2018.

## Materials and methods

### Russian Federation

Analysis of measles incidence was based on the State Statistical Monitoring Form No. 2 and real-time daily and weekly reports.

**Materials.** Blood samples were collected from ill patients (between 4 and 7 days after onset of rash) and sent from the region to the SPbRC Laboratory of Virology. Nasal swabs, throat swabs, and/or urine samples were collected (within three days after the onset rash) and delivered to the National Laboratory for Measles and Rubella Diagnostics (of Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow). In 2017–2018, a total of 944 serum samples from patients ill with measles, rubella, or exanthematous diseases were delivered to the SPbRC.

**Methods.** Analysis of serum samples was carried out by ELISA using an IgM measles test system (Vector-Best, Russia). At the virological laboratory of the National Research Center (NRC, Russia) for measles and rubella surveillance, 54 samples from patients with a confirmed “measles-positive” diagnosis were further tested by molecular-genetic methods (PCR and sequencing).

### The Republic of Serbia

**Case definitions.** A suspected measles case was defined as one which matches the following clinical criteria: generalized, maculopapular rash lasting more than 3 days; temperature  $\geq 38.3^{\circ}\text{C}$ ; cough; coryza; conjunctivitis. Measles cases were classified according to WHO criteria [9,10], using the categories: clinically-compatible, epidemiologically-linked, or laboratory-confirmed; as well as definition by origin (endemic, imported, import-related, or unknown). Laboratory-confirmed measles was defined as a case that meets the clinical case definition and has laboratory data (positive for measles-specific IgM antibodies in the blood, and/or measles RNA detected in nose/throat swabs by PCR). Epidemiologically-linked was defined as a case which meets the clinical case definition and is linked to a laboratory-confirmed case.

**Sample collection and laboratory testing.** From October 2017 to June 2019, 5,789 patients were recorded; of those, 2,946 were confirmed by laboratory analysis [5]. Sera were collected within 21 days, and nose/throat swabs within 5 days after onset of rash. Laboratory analysis included detection of measles-specific IgM antibodies using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Enzygnost®, Siemens Healthcare Diagnostic Products GmbH, Marburg, Germany) and/or detection of measles RNA in nose/throat swabs by real-time PCR. Briefly, RNA was extracted from 140  $\mu\text{l}$  of nose/throat swab samples using the QIAamp viral RNA kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer’s instructions. Using primers and probes from the Statens Institute (Denmark), amplification was done in a 25  $\mu\text{l}$  volume containing 5  $\mu\text{l}$  of extracted RNA and 20  $\mu\text{l}$  of master mix; an Mx3005P (Stratagene) instrument was used for thermal cycling. Serological and molecular analyses were performed at the National Measles/Rubella Reference Laboratory of the Torlak Institute of Virology, Vaccine and Sera.

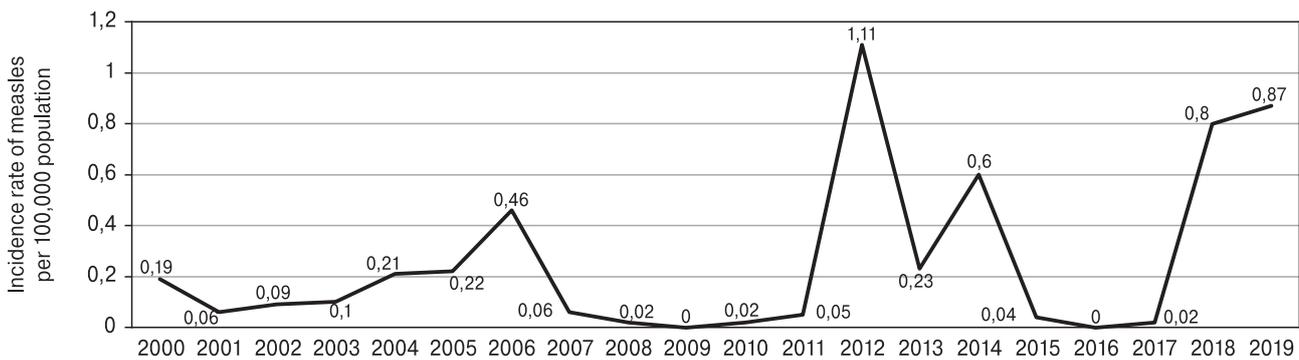
**Phylogenetic Analysis.** Clinical samples (nasal/throat swabs) from 125 measles-positive patients (as determined by PCR) were sent to the WHO European Regional Reference Laboratory (Luxembourg) for sequencing and genotyping. Using molecular evolutionary genetics analysis software [18] with recommended reference sequences [21, 23], a neighbour-joining phylogenetic tree, based on the Kimura two-parameter method, was constructed. Specifically, 450 nucleotides, which encode the carboxyl-terminal 150 amino acids of the measles virus nucleoprotein, were analyzed. Statistical analysis of the data was carried out using the Student’s t-test.

## Results and discussion

The SPbRC serves 11 administrative regions located in Northwestern Russia. Collectively, they represent approximately 14 million people. Measles incidence in Northwestern Russia has featured surges and falls since the year 2000 (fig. 1).

During the 2007–2011 period, sporadic imported measles cases were recorded in the district. In 2012, an upsurge in measles incidence took place due mostly to transfer of measles infection to a pediatric hospital in St. Petersburg; there, a focus of measles infection formed totaling 94 cases [1]. Several conditions were conducive to the spread of infection within the hospital: late diagnosis and isolation of the first patient with measles; placement of the afflicted patient in a unit with a majority of non-vaccinated (because of their age or health status) children; and movement of the patient within the hospital for diagnostic and treatment procedures.

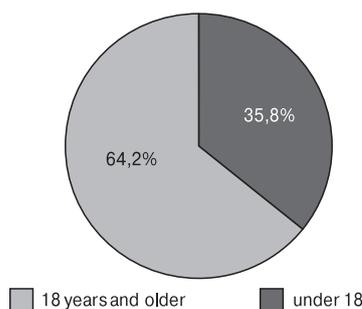
Later, the number of cases decreased, leading to a complete absence of measles in 2016. An upsurge in measles incidence took place in 2018. In total, 109



**Figure 1. Incidence of measles in the Northwest Federal District of Russia, 2000–2019 (per 100,000 population)**

cases were recorded, and the incidence rate was 0.79 per 100,000 population. Measles was registered in 6 out of 11 regions, and the largest number of cases were reported in three regions: Saint Petersburg — 54 cases (1.02 per 100,000 population); Leningrad Region — 21 cases (1.22 per 100,000 population); and the Republic of Karelia — 29 cases (4.62 per 100,000 population). In 2018, five imported cases were registered from Italy, France, Turkey, and Ukraine. In addition, 25 measles cases were imported from other Russian regions. The largest number of cases were from three areas of the North Caucasian Federal District: the Republic of Dagestan; the Republic of Ingushetia; and the Chechen Republic.

In St. Petersburg, 3 foci of nosocomial transmission and 3 foci of familial infection occurred. In the Leningrad Region (the area surrounding, but not including St. Petersburg), two foci of familial infection were seen. In addition, a measles outbreak (29 cases) occurred in the Republic of Karelia which lasted for a month; mass illness started in late June 2018, and the last case was recorded on July 23. The cause behind the intense measles incidence in the Republic was a missed measles case in the middle of June. The patient received a diagnosis of “enterovirus infection” and was not tested for measles. Among the affected were 5 non-vaccinated medical workers at a district hospital and 5 measles cases due to visits to a clinic. The age structure of measles patients



**Figure 2. Age structure of measles patients in regions served by the SPbRC, 2018**

in regions served by the SPbRC, for 2018, is presented in figure 2. Children represented 35.8% of the affected patients.

Analysis of patients’ vaccination status showed that the afflicted were predominantly in the category of “unvaccinated, or of unknown vaccination status” (74.3%). In addition, among the affected persons known to have received vaccination, cases were as follows: 6.4% were patients who had been covered by one-dose vaccine; and 18.4% were people who had been covered by two-dose vaccine (fig. 3).

Molecular-genetic analysis showed that different genotypes of measles virus were detected from SPbRC regions. In St. Petersburg, the genotypes B3 Kabul, B3 Dublin, D8 Frankfurt, D8 Cambridge, and D8 GirSomnath were detected. Cases in the Leningrad Region featured D8 Frankfurt, and the measles outbreak in The Republic of Karelia was due to the D8 GirSomnath genotype. These data indicate multiple importations of various measles genotypes from abroad, as well as from other Russian regions.

In the Republic of Serbia, following several years of very low immunization coverage (two-dose MMR vaccine), cases began to rise. From early October 2017 to June 2019 in Serbia (including regions served by the National Institute of Public Health of Kosovo, Mitrovica), 5,798 measles cases were recorded, of which 2,946 were laboratory confirmed [5, 12]. At the end of December 2017, the first measles death was reported in the Republic of Serbia in 20 years. By the end of April 2018, another 14 deaths due to measles had been reported. Out of the total number of patients, 33% were hospitalized. Regarding serious complications of measles, 2 patients had brain inflammation and 587 patients were diagnosed with pneumonia. The most affected groups were children under 5 years of age and adults aged 30 and over. The youngest patient was 15 days old, and the oldest was 71 years old. Nearly 95% of the patients were either unvaccinated, incompletely-vaccinated, or of unknown vaccination status. The main strain of the measles virus was the genotype B3 Dublin variant. Sequence data identified the genotype B3, Dublin variant in 123 nose/throat swab samples. In one patient from Novi Sad,

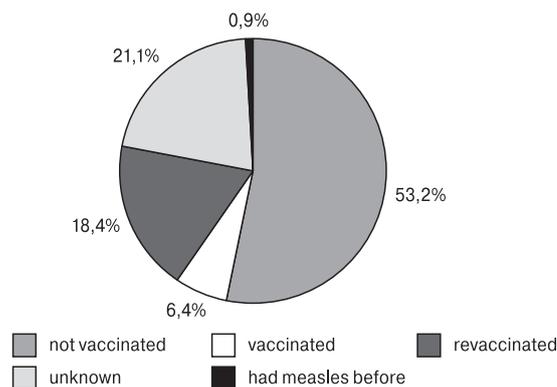
the D8 genotype (GirSomnath variant, import case) was detected. In another patient from Pancevo, the D8 genotype (Herborn variant, import case) was detected.

Mandatory measles immunization with a single monovalent dose, targeting all children aged 12–15 months, was introduced in Serbia in 1971. The bivalent measles–mumps vaccine was introduced into the immunization program in 1981. In 1993, bivalent MM vaccine was replaced with a combined measles–mumps–rubella (MMR) vaccine. From 1994, the trivalent MMR vaccine began to be delivered using a two–dose schedule: once at the age of 12–15 months; and once at 12 years of age. The second dose was moved to preschool age (6–7 years) in 2006, and if the child misses the second dose, he/she is to be re-vaccinated before the age of 15 years. Over the last seven years, full MMR coverage (both doses received) has been below 95% [15, 19]. Vaccination coverage for second dose MMR vaccine in last ten years was significantly lower than 95%. In 2017, the rates were: 1<sup>st</sup> dose — 85.2% and 2<sup>nd</sup> dose — 91.6%.

Following the introduction of measles vaccination in Serbia in 1971, the disease has appeared in epidemic form every 3 to 5 years, but with a much smaller number of cases compared to the period before the introduction of the vaccine. Large outbreaks were registered in 1986, 1989, 1993, 1997, 2007, 2011, and 2015 [7, 17]. Only a few sporadic measles cases were reported between these outbreaks. In Serbia, there were no recorded measles-associated deaths in the time period from the 1997 measles outbreak (which affected approximately 4,000 people) until December 2017.

## References

1. Бичурина М.А., Тимофеева Е.В., Железнова Н.В., Игнатъева Н.А., Шульга С.В., Лялина Л.В., Дегтярев О.В. Вспышка кори в детской больнице Санкт-Петербурга в 2012 году // Журнал инфектологии. 2013. Т. 5, № 2. С. 96–102. [Bichurina M.A., Timofeeva E.V., Zheleznova N.V., Ignat'eva N.A., Shul'ga S.V., Lyalina L.V., Degtyarev O.V. Measles outbreak in a children's hospital in Saint Petersburg in 2012. *Zhurnal infektologii = Journal Infectology*, 2013, vol. 5, no. 2, pp. 96–102. (In Russ.)]
2. Результаты сертификации территорий СЗФО на отсутствие циркуляции эндемичного вируса кори: Аналитический обзор. СПб.: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2012. 60 с. [Results of certification of the territories of NFD for the absence of endemic measles virus circulation: analytical review. *St. Petersburg: St. Petersburg Pasteur Institute*, 2012. 60 p. (In Russ.)]
3. Совершенствование эпидемиологического надзора за корью в Северо-Западном федеральном округе России на этапе ликвидации инфекции: Аналитический обзор. ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2008. 52 с. [Improving epidemiological surveillance for measles in the Northwestern Federal District of Russia at the stage of infection elimination: analytical review. *St. Petersburg: St. Petersburg Pasteur Institute*, 2008. 52 p. (In Russ.)]
4. Шульга С.В., Тихонова Н.Т., Наумова М.А. Изменение спектра циркулирующих генотипов вируса как показатель элиминации индигенной кори в России // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2009. № 4. С. 4–9. [Shul'ga S.V., Tikhonova N.T., Naumova M.A. Change the spectrum of circulating genotypes of the virus as index of elimination of the indigenous measles in Russia. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2009, no. 4, pp. 4–9. (In Russ.)]
5. Actual epidemiological situation of measles in Serbia. Belgrade: Institute of Public Health of Serbia, 2019. URL: <http://www.batut.org.rs/index.php?content=1629> (03.08.2019).
6. Andrianou X.D., Del Manso M., Bella A., Vescio M.F., Baggieri M., Rota M.C., Pezzotti P., Filia A. Spatiotemporal distribution and determinants of measles incidence during a large outbreak, Italy, September 2016 to July 2018. *Euro Surveill.*, 2019, vol. 24, no. 17: 1800679. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.17.1800679
7. Annual report on the immunization in the Republic of the Serbia in 2011. Belgrade: Institute of Public Health of Serbia. URL: <http://www.batut.org.rs/download/izvestaji/Rezultati%20o%20sprovedenoj%20imunizaciji%202011> (03.08.2019).
8. 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, no. 37: 30614. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.37.30614
9. Manual for the laboratory-based surveillance of measles, rubella, and congenital rubella syndrome. 3<sup>rd</sup> ed. WHO, 2018. URL: [https://www.who.int/immunization/monitoring\\_surveillance/burden/laboratory/manual/en](https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/laboratory/manual/en) (15.12.2019).



**Figure 3. Distribution of measles patients by vaccination status in the regions served by the SPbRC, 2018**

Since 2013, there has been a growing, vocal anti-vaccination movement and a consequent rejection of immunization by some parents. This, combined with high-risk populations who remain outside of the immunization system, has led to a critical mass of unvaccinated individuals that disrupts the collective immunity of the population. In light of these facts, elimination of measles on a global scale will require synchronized efforts in several key areas: maintenance of sustained, high levels of routine immunization (95% or above); enactment of additional immunization campaigns for risk groups (including certain healthcare workers); and activities to counter the anti-vaccination lobby.

10. Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection. 2<sup>nd</sup> ed. Geneva: WHO, 2006. 22 p.
11. Measles update. Bulletin WHO. June 14, 2019. URL: <https://www.who.int/csr/don/06-may-2019-measles-euro/en> (08.10.2019).
12. Nedeljković J., Rakić Adrović S., Tasić G., Kovačević-Jovanović V., Lončarević G., Hübschen J.M., Müller C.P. Resurgence of measles in Serbia 2010–2011 highlights the need for supplementary immunization activities. *Epidemiol. Infect.*, 2016, vol. 144, no. 5, pp. 1121–1128. doi: 10.1017/S0950268815002277
13. Orenstein W.A., Hinman A., Nkowane B., Olive J.M., Reingold A. Measles and rubella global strategic plan 2012–2020 midterm review. *Vaccine*, 2018, vol. 36, suppl. 1, pp. A1–A34. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.09.026
14. Orosz L., Gáspár G., Rózsa Á., Rákos N., Sziveri S., Bosnyákovits T. Epidemiological situation of measles in Romania, Italy, and Hungary: On what threats should we focus nowadays? *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, 2018, vol. 65, no. 2, pp. 127–134. doi: 10.1556/030.65.2018.014
15. Report on immunization conducted on the territory of the Republic of Serbia in 2018. URL: <http://www.batut.org.rs/index.php?content=1900> (In Serb.)
16. Ristić M., Milošević V., Medić S., Djekić Malbaša J., Rajčević S., Boban J., Petrović V. Seroepidemiological study in prediction of the risk groups for measles outbreaks in Vojvodina, Serbia. *PLoS One*, 2019, vol. 14, no. 5: e0216219. doi: 10.1371/journal.pone.0216219
17. Šeguljev Z., Đurić P., Petrović V., Stefanović S., Čosić G., Hrnjaković I.C., Milošević V., Karagiannis I., Boxall N., Janković D. Current measles outbreak in Serbia: a preliminary report. *Euro Surveill.*, 2007, vol. 12, no. 11: E070315.2. doi: 10.2807/esw.12.11.03155-en
18. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipiński A., Kumar S. MEGA 6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 2013, vol. 30, no. 12, pp. 2725–2759. doi: 10.1093/molbev/mst197
19. The results of conducted immunization in the Republic of Serbia in 2015–2016. Belgrade: Institute of Public Health of Serbia, 2016. 57 p. (In Serb.)
20. World Health Organization. Eliminating measles and rubella and preventing congenital rubella infection: WHO European Region strategic plan 2005–2010. URL: [http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0008/79028/E87772.pdf](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0008/79028/E87772.pdf).
21. World Health Organization. Genetic diversity of wild-type measles virus and the global measles nucleotide surveillance database (MeaNS). *Wkly Epid. Rec.*, 2015, vol. 90, no. 30, pp. 373–380.
22. World Health Organization. Global Vaccine Action Plan 2011–2020. URL: [http://www.who.int/immunization/global\\_vaccine\\_action\\_plan/GVAP\\_doc\\_2011\\_2020/en](http://www.who.int/immunization/global_vaccine_action_plan/GVAP_doc_2011_2020/en)
23. World Health Organization. Measles virus nomenclature update: 2012. *Wkly Epid. Rec.*, 2012, vol. 87, no. 9, pp. 73–80.
24. Zimmerman L.A., Muscat M., Singh S., Ben Mamou M., Janković D., Datta S., Alexander J.P., Goodson J.L., O'Connor P. Progress Toward Measles Elimination — European Region, 2009–2018. *MMWR*, 2019, vol. 68, no. 17, pp. 396–401.

**Авторы:**

**Стоилькович В.Д.**, и.о. директора Института вирусологии, вакцин и сывороток «Торлак», Белград, Сербия;  
**Бичурина М.А.**, д.м.н., зав. вирусологической лабораторией центра по элиминации кори и краснухи ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;  
**Лаврентьева И.Н.**, д.м.н., зав. лабораторией экспериментальной вирусологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;  
**Филипович-Вигньевич С.Б.**, ассистент директора по диагностике и научному развитию, руководитель Национальной референс-лаборатории по гриппу Института вирусологии, вакцин и сывороток «Торлак», Белград, Сербия;  
**Банцевич М.Д.**, д.м.н., специалист в области медицинской микробиологии, зав. Национальной референс-лабораторией по кори и краснухе отдела серологии и молекулярной диагностики Института вирусологии, вакцин и сывороток «Торлак», Белград, Сербия;  
**Железнова Н.В.**, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории вирусных гепатитов ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;  
**Антипова А.Ю.**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

**Authors:**

**Stoiljkovic V.D.**, Acting Managing Director of Institute for Virology, Vaccine and Sera "Torlak", Belgrade, Serbia;  
**Bichurina M.A.**, PhD, MD (Medicine), Head of the Virological Laboratory of Measles and Rubella Elimination, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Lavrentieva I.N.**, PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory of Experimental Virology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Filipovic-Vignjevic S.B.**, Director Assistant for Diagnostics and Scientific Development, Head of National Reference Laboratory for Influenza, Institute for Virology, Vaccine and Sera "Torlak", Belgrade, Serbia;  
**Bancevic M.D.**, PhD, MD (Medicine), Specialist in Medical Microbiology, Head of National Reference Laboratory for Measles and Rubella, Department of Serology and Molecular Diagnostics, Institute for Virology, Vaccine and Sera "Torlak", Belgrade, Serbia  
**Zheleznova N.V.**, PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Viral Hepatitis, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Antipova A.Yu.**, PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Experimental Virology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 10.12.2019  
 Отправлена на доработку 16.01.2020  
 Принята к печати 11.03.2020

Received 10.12.2019  
 Revision received 16.01.2020  
 Accepted 11.03.2020

# VNTR ЛОКУСЫ КАК ИНДИКАТОРЫ ПРОЛИНЗАВИСИМЫХ ШТАММОВ МИКРОБА ЧУМЫ (*YERSINIA PESTIS*) В ЦЕНТРАЛЬНО-КАВКАЗСКОМ ВЫСОКОГОРНОМ ПРИРОДНОМ ОЧАГЕ ЧУМЫ

В.М. Дубянский<sup>1</sup>, А.С. Волынкина<sup>1</sup>, А.П. Анисимов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

<sup>2</sup> ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Московская область, Россия

**Резюме.** MLVA типирование микроба чумы используют как для поиска сходств и различий между отдельными изолятами при проведении эпидемиологических расследований, так и для клональной кластеризации внутривидовых филогенетических групп для решения вопросов микроэволюции и таксономии. Нельзя исключить, что наиболее вариабельные локусы могут являться индикаторами, позволяющими аппроксимировать уникальные свойства штаммов, циркулирующих в определенных природных очагах чумы. Удобной моделью для проверки этой гипотезы может быть Центрально-Кавказский высокогорный природный очаг чумы, отличающийся гетерогенностью циркулирующих в нем штаммов, в том числе по про- и ауксотрофии по пролину. Целью нашей работы было определение сочетающихся с пролинзависимостью частот аллелей VNTR локусов штаммов возбудителя чумы, определяемых при MLVA-25 типировании в Центрально-Кавказском высокогорном природном очаге чумы. Основной задачей являлось выявление наиболее информативных наборов аллелей VNTR локусов, пригодных для прогнозирования про- и ауксотрофии (pro<sup>+</sup>, pro<sup>–</sup>) по пролину. Было обнаружено, что локусы ms45, ms56, ms46, ms07, ms69, ms62 являются высоковариабельными по частотам аллелей и/или имеют достоверное различие средних частот аллелей VNTR локусов про- и ауксотрофных штаммов микроба чумы. Анализ частот аллелей локуса ms45 показал, что в случае выявления аллелей, содержащих 6 повторов, с вероятностью 0,944 ожидается pro<sup>+</sup> штамм, при 7 повторах локуса ms45 с вероятностью 0,783 pro<sup>–</sup> штамм, при 9 повторах локуса ms56 с вероятностью 0,933 штамм pro<sup>+</sup>, свыше 18 tandemных повторов локуса ms46 вероятность pro<sup>+</sup> фенотипа равна 0,818. Проведенная диагностика на pro<sup>+</sup>/pro<sup>–</sup> свойство штаммов с использованием статистических методов показала ошибку 13,33% для pro<sup>–</sup> штамма и 26,67% для pro<sup>+</sup> штамма. Все штаммы pro<sup>+</sup>, которые имели комплекс из 6 tandemных повторов ms45, 9 повторов ms56 и 29–30 повторов ms46 безошибочно диагностировались с использованием только этих 3 локусов. Таким образом, возможно прогнозировать некоторые свойства штаммов микроба чумы, исходя из значений частот аллелей локусов. С увеличением числа

---

**Адрес для переписки:**

Дубянский Владимир Маркович  
355035, Россия, г. Ставрополь, ул. Советская, 13–15,  
ФКУЗ Ставропольский противочумный институт.  
Тел.: 8 (8652) 26-03-12.  
E-mail: stavnipchi@mail.ru

**Contacts:**

Vladimir M. Dubyanskiy  
355035, Russian Federation, Stavropol, Sovetskaya, 13–15,  
Stavropol Research Anti-Plague Institute.  
Phone: +7 (8652) 26-03-12.  
E-mail: stavnipchi@mail.ru

**Библиографическое описание:**

Дубянский В.М., Волынкина А.С., Анисимов А.П. VNTR локусы как индикаторы пролинзависимых штаммов микроба чумы (*Yersinia pestis*) в Центрально-Кавказском высокогорном природном очаге чумы // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 4. С. 735–740. doi: 10.15789/2220-7619-VLA-770

**Citation:**

Dubyanskiy V.M., Volynkina A.S., Anisimov A.P. VNTR loci as indicators of proline-dependent plague microbe strains (*Yersinia pestis*) in the central caucasian mountain natural plague focus // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 4, pp. 735–740. doi: 10.15789/2220-7619-VLA-770

*Работа выполнена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на 2016–2020 гг. «Проблемно-ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями» (ДВМ и ВАС). АПА поддержан грантом Минобрнауки России (Соглашение № 075-15-2019-1671 от 31 октября 2019 г.).*

MLVA типированных штаммов микроба чумы, выделенных в этом очаге, можно ожидать увеличения возможностей для прогнозирования их свойств по значениям tandemных повторов в локусах, имеющих диагностическую ценность.

**Ключевые слова:** чума, природный очаг, штамм, VNTR локусы, MLVA, прогнозирование.

## VNTR LOCI AS INDICATORS OF PROLINE-DEPENDENT PLAGUE MICROBE STRAINS (*YERSINIA PESTIS*) IN THE CENTRAL CAUCASIAN MOUNTAIN NATURAL PLAGUE FOCUS

Dubyanskiy V.M.<sup>a</sup>, Volynkina A.S.<sup>a</sup>, Anisimov A.P.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

<sup>b</sup> State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

**Abstract.** *Y. pestis* MLVA typing is used both to seek for similarities and differences between individual isolates upon conducting epidemiological investigations as well as for clonal clustering of intraspecies phylogenetic groups while analyzing microevolution and taxonomy issues. It cannot be ruled out that the most variable loci may be indicators allowing to approximate the unique strain-related properties circulating in certain natural plague foci. The Central Caucasian Highland Natural Plague Focus distinguished by heterogeneity of the circulating strains therein, including proline pro- and auxotrophy, may represent a convenient model for testing this hypothesis. The purpose of our work was to assess the frequencies of the VNTR alleles associated with proline dependence among the *Y. pestis* strain VNTR loci, determined during previous MLVA-25 typing in the Central Caucasian Highland Natural Plague Focus. The main task was to identify the most informative sets of VNTR loci suitable for predicting proline pro- and auxotrophy (pro<sup>+</sup>, pro<sup>-</sup>). It was found that the loci ms45, ms56, ms46, ms07, ms69, ms62 displayed peak variability by allele frequencies and/or exhibited significant differences of mean allele frequencies in the pro<sup>-</sup> and pro<sup>+</sup> strains. In particular, it was showed that the alleles of the ms45 locus contained 6 tandem repeats suggesting probability for pro<sup>+</sup> reaching 0.944, whereas the alleles of the ms45 locus contained 7 tandem repeats with expected probability for pro<sup>-</sup> reaching 0.783. Moreover, the ms56 and ms46 contained 9 and more than 18 tandem repeats, respectively, thereby pointing at probability for pro<sup>+</sup> equal to 0.933 and 0.818, respectively. Diagnostics for pro<sup>+</sup>/pro<sup>-</sup> phenotype by using specific statistical methods demonstrated statistical error 13.33% and 26.67% for the pro<sup>-</sup> and pro<sup>+</sup> strains, respectively. All pro<sup>+</sup> strains bearing a 6 tandem repeat complex from the ms45 locus, 9 tandem repeats derived from the ms56 locus and ms46 locus-derived 29–30 tandem repeats were accurately diagnosed solely based on these 3 loci. Thus, it is possible to predict some properties of *Y. pestis* strains based on determining the allele frequencies. While the number of MLVA typed plague strains isolated in such natural focus has been progressively increased, it may be expected that opportunities for prognosing their properties based on determining locus tandem repeat composition having diagnostic value would be elevated.

**Key words:** plague, natural focus, strain, VNTR loci, MLVA, prediction.

MLVA типирование штаммов микроба чумы используют как для поиска сходств и различий между отдельными изолятами при проведении эпидемиологических расследований, так и для клональной кластеризации внутривидовых филогенетических групп для решения вопросов микроэволюции и таксономии [3, 5, 6, 7, 8]. Разные VNTR локусы имеют разный уровень вариабельности [2]. Нельзя исключить, что наиболее вариабельные локусы могут являться индикаторами, позволяющими аппроксимировать уникальные свойства штаммов из определенных природных очагов чумы и даже отдельных клональных кластеров, циркулирующих в этих очагах. Удобной моделью для проверки этой гипотезы может быть Центрально-Кавказский высокогорный природный очаг чумы, отличающийся гетерогенностью циркулирующих в нем штаммов, в том числе по про- и ауксотрофии по пролину, предположительно связанной с присутствием в геноме плазмиды рСКФ [3, 4].

Целью нашей работы было определение сочетающихся с пролинзависимостью частот аллелей VNTR локусов штаммов возбудителя чумы, определяемых при MLVA-25 типировании в Центрально-Кавказском высокогорном природном очаге чумы.

Основной задачей являлось выявление наиболее информативных наборов аллелей VNTR локусов, пригодных для прогнозирования про- и ауксотрофии (pro<sup>+</sup>, pro<sup>-</sup>) по пролину.

## Материалы и методы

В работе были использованы данные о MLVA-25 типировании 62 штаммов *Y. pestis*, изолированных в Центрально-Кавказском высокогорном природном очаге чумы с 1971 по 2004 г. MLVA проводили по 25 VNTR-локусам *Y. pestis*, как описано ранее [7]. Вариабельность частот локусов вычисляли функцией «Описательная статистика» таблиц Microsoft Excel. Для выяв-

ления группы наиболее вариабельных локусов использовали анализ квартилей. Достоверность различий между средними значениями частот локусов определяли по методу U Манна–Вилкоксона–Уитни, а уровень информативности вычисляли с помощью формулы Кульбака [1]. Для расчета информативности локусов штаммы pro+ обозначали как «1», а штаммы pro– как «0». Частота tandemных повторов локусов делилась на шесть диапазонов [1]. Порядок диагностики с использованием информативности Кульбака и непрерывной последовательной статистической процедуры распознавания подробно описан в монографиях Е.В. Гублера [1] и М.А. Дубянского с соавт. [2].

## Результаты

Вариабельность частот аллелей локусов представлена в таблице 1.

Из анализа исключили локусы, имеющие нулевой минимум частоты, так как другие частоты при этом не менялись. В конечном итоге для дальнейших исследований использовали значения величин аллелей локусов ms04, ms06, ms07, ms45, ms46, ms54, ms56, ms62, ms69, ms70, ms74.

Выборка содержит 47 штаммов pro– и 15 штаммов pro+. Первоначальное выявление наборов аллелей VNTR локусов, информативных относительно pro+, pro– штаммов микроба чумы мы проводили, сравнивая средние частоты аллелей протрофных и ауксотрофных штаммов (табл. 2).

Согласно квартильному анализу, наиболее вариабельные локусы (имеющие значения интервала выше 3 квартиля) — ms46 и ms62.

Аллели VNTR локусов ms54 и ms74 мы исключили из дальнейшего анализа, так как они не имеют достоверных различий средних значений частот VNTR локусов относительно pro- и ауксотрофных штаммов *Y. pestis* и не являются высоковариабельными. Локус ms62 интересен для анализа, так как имеет высокую вариабельность.

Используя метод, описанный у Е.В. Гублера [1], мы ранжировали локусы в порядке их информативности от большей к меньшей для pro+

**Таблица 1. Вариабельность частот аллелей VNTR локусов штаммов *Yersinia pestis* из Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы**

Table 1. Variability of *Yersinia pestis* VNTR allele prevalence in the Central Caucasus Mountain Natural Plague Focus

Наименование локуса Locus name	Интервал частот Allele range	Минимум частот Min allele frequency	Максимум частот Max allele frequency
ms01	0	7	7
ms04	1	5	6
ms05	0	10	10
ms06	2	2	4
ms07	2	8	10
ms09LowRes	0	24	24
ms15	0	10	10
ms20	0	8	8
ms21	9	0	9
ms35	0	9	9
ms38	0	6	6
ms40	8	0	8
ms41	0	5	5
ms44	8	0	8
ms45	1	6	7
ms46	24	6	30
ms51	0	2	2
ms54	2	7	9
ms56	2	7	9
ms62	8	8	16
ms69	3	5	8
ms70	11	0	11
ms71	5	0	5
ms73	0	5	5
ms74	2	6	8

и pro– штаммов. В этом порядке приводим распределение частот аллелей для pro+, pro– штаммов, которое показало следующее.

Локус ms45 у pro+ штаммов имеет 6 tandemных повторов у 11 штаммов (73,33%) из 15. Только 2 штамма pro– (4,25%) имеют 7 tandemных повторов в этом локусе.

**Таблица 2. Достоверность различий средних значений частот аллелей VNTR локусов**

Table 2. Significant differences between mean VNTR allele frequencies

Аллели Allele	ms04	ms06	ms07	ms45	ms46	ms54	ms56	ms62	ms69	ms74
Mean pro+	6,00	3,00	8,40	6,27	17,67	7,27	8,2	12,33	5,27	8,00
Mean pro–	5,62	3,34	8,96	6,96	9,21	7,10	7,34	12,70	6,00	7,85
U	0,05	0,01	0,01	-0,01	0,01	-	-0,02	-	-0,01	-

**Примечание.** Знак «-» означает отсутствие достоверных различий.

Note. Sign “-” denotes lack of significant differences.

**Таблица 3. Данные для диагностики принадлежности штаммов *Yersinia pestis* к pro+ или к pro-**Table 3. pro+/pre- *Yersinia pestis* prevalence

Диапазоны частот тандемных повторов Range of tandem repeat frequencies		Диагностический коэффициент Diagnostic ratio	Информативность Informativity	Сумма информативностей локуса Overall locus informativity
от/from	до/to			
<b>Локус ms45/ms45 locus</b>				
5,66	5,82	12,36369	0,42703	
5,83	5,99	12,36369	0,854059	
6	6,17	12,36369	1,708119	
6,18	6,35	12,36369	0,854059	
6,36	6,53	12,36369	0,42703	
6,54	6,71	-5,55146	0,191742	
6,72	6,89	-5,55146	0,383484	
6,9	7,07	-5,55146	0,766968	
7,08	7,25	-5,55146	0,383484	
7,26	7,43	-5,55146	0,191742	6,187716
<b>Локус ms56/ms56 locus</b>				
6,34	6,66	-2,44356	0,036913	
6,67	6,99	-2,44356	0,073827	
7	7,33	-2,82145	0,206506	
7,34	7,67	-3,79055	0,211303	
7,68	8,01	-6,34327	0,419736	
8,02	8,35	0,352758	0,000826	
8,36	8,69	5,471591	0,235162	
8,7	9,03	11,49219	1,281257	
9,04	9,37	11,49219	0,640629	
9,38	9,71	11,49219	0,320314	3,426472
<b>Локус ms46/ms46 locus</b>				
-2	1,99	-4,20447	0,091544	
2	5,99	-4,87394	0,269277	
6	10	-3,93295	0,386322	
10,01	14,01	-2,30992	0,11353	
14,02	18,02	1,949766	0,070523	
18,03	22,03	7,690079	0,638113	
22,04	26,04	9,061811	0,476227	
26,05	30,05	8,317987	0,307353	
30,06	34,06	6,209453	0,062975	
34,07	38,07	7,970366	0,044657	2,460521
<b>Локус ms07/ms07 locus</b>				
7,34	7,66	8,481891	0,218364	
7,67	7,99	8,481891	0,436727	
8	8,33	3,63381	0,288385	
8,34	8,67	0,188853	0,000804	
8,68	9,01	-2,10789	0,144861	
9,02	9,35	-3,49091	0,172317	
9,36	9,69	-3,79055	0,105651	
9,7	10,03	0	0	
10,04	10,37	0	0	
10,38	10,71	0	0	1,36711
<b>Локус ms69/ms69 locus</b>				
4	4,49	12,36369	0,42703	
4,5	4,99	2,297387	0,081793	
5	5,5	2,297387	0,163587	
5,51	6,01	-1,79482	0,116345	
6,02	6,52	-1,79482	0,058173	
6,53	7,03	-5,55146	0,191742	
7,04	7,54	0	0	
7,55	8,05	0	0	
8,06	8,56	0	0	
8,57	9,07	0	0	1,03867

Диапазоны частот тандемных повторов Range of tandem repeat frequencies		Диагностический коэффициент Diagnostic ratio	Информативность Informativity	Сумма информативностей локуса Overall locus informativity
от/from	до/to			
<b>Локус ms62/ms62 locus</b>				
5,34	6,66	0	0	
6,67	7,99	-2,02963	0,008061	
8	9,33	-0,8123	0,005012	
9,34	10,67	2,504939	0,091492	
10,68	12,01	1,463713	0,053047	
12,02	13,35	1,74292	0,07874	
13,36	14,69	-1,54902	0,046471	
14,7	16,03	-3,07699	0,116314	
16,04	17,37	-7,08113	0,193852	
17,38	18,71	-5,03993	0,036817	0,629806

В исследуемой выборке нам ни разу не попались штаммы pro+ с 8 тандемными повторами локуса ms56, но они были среди pro- штаммов (25,53%). В свою очередь, у 9 pro+ штаммов (60%) присутствовало 9 тандемных повторов, а у pro- — только у 2 (4,26%). У обоих разновидностей штаммов часто встречается по 7 тандемных повторов (у 40% pro+ и 70,2% pro-).

Локус ms46 имеет высокую вариабельность частот аллелей. Для pro+ штаммов характерна группа частот аллелей 20, 21, 29 и 30 (всего 7 штаммов или 46,67% от всех pro+ штаммов). При этом в выборке нет ни одного pro- штамма с этими частотами аллелей. В то же время 11 (23,4%) pro- штаммов имеют частоты аллелей 11, 12, 13, и нет ни одного штамма pro+ с этими частотами.

Распределение частот у локусов ms07, ms69, ms62 не имеет ярко выраженных особенностей по отношению к pro+ или pro- штаммам.

## Обсуждение

Анализ частот аллелей локуса ms45, проведенный по Е.В. Гублеру [1], показал, что в случае выявления аллелей, содержащих 6 повторов, в 94,44% случаев ожидается pro+. Если же штамм имеет 7 повторов локуса ms45, то он может оказаться pro- в 78,26%.

В случае если у локуса ms56 обнаруживали 9 тандемных повторов, то с вероятностью 0,933 это был штамм pro+.

У локуса ms46 при обнаружении числа тандемных повторов свыше 18 вероятность pro+ фенотипа равна 0,818.

Число повторов у локусов ms07, ms69, ms62 не имеет высокой диагностической ценности.

Наличие выраженных групп частот аллелей локусов, относящихся к pro+ или pro- штаммам, позволяет проводить диагностику этого свойства с использованием неоднородной последовательной процедуры распознавания [1, 2]. Мы провели тестовую диагностику для всех 15 pro+ штаммов, которые имелись у нас, и 15 pro-

штаммов (табл. 3). Неверно диагностировано два pro- штамма (как pro+) — ошибка составила 13,33% — и четыре pro+ штамма (как pro-) — ошибка составила 26,67%.

Все штаммы pro+, которые имели комплекс из 6 тандемных повторов ms45, 9 повторов ms56 и 29–30 повторов ms46 безошибочно диагностировались с использованием только этих 3 локусов. В используемой базе данных этот комплекс локусов и тандемных повторов уникален для pro+ штаммов.

Ранее аналогичный подход — определение набора VNTR локусов, позволяющих строить филограммы штаммов *Y. pestis*, полностью соответствующие «золотому стандарту» эволюционных деревьев, SNP-дендрограммам, — был успешно продемонстрирован нашими китайскими коллегами [6], отобравшими для этих целей 26 из 88 исследованных VNTR локусов.

## Заключение

Несмотря на относительно небольшую выборку MLVA типированных штаммов микроба чумы из Центрально-Кавказского высокогорного природного очага, удалось выявить аллели-индикаторы (и их группы) ауксотрофности или протрофности по отношению к пролину. На этом примере мы продемонстрировали, что имеется возможность прогнозировать некоторые свойства штаммов микроба чумы, исходя из значений частот аллелей локусов. Пока ошибка прогноза довольно велика, хотя нами выявлен комплекс тандемных повторов в некоторых локусах, которые уникальны для pro+ штаммов. Следовательно, с увеличением числа MLVA типированных штаммов микроба чумы, выделенных в этом очаге, с определением их ауксотрофности или протрофности по отношению к пролину можно ожидать увеличения возможностей для прогнозирования их свойств по значениям тандемных повторов в локусах, имеющих диагностическую ценность.

## Благодарности

Авторы благодарят Кузнецову И.В., врача-бактериолога лаборатории биохимии ФКУЗ Ставро-

ропольский противочумный институт Роспотребнадзора, за возможность воспользоваться базой данных свойств микроба чумы Центрально-Кавказского высокогорного природного очага.

## Список литературы/References

1. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. Л.: Медицина, 1978. 296 с. [Gubler E.V. Computational methods of analysis and recognition of pathological processes. *Leningrad: Medicine*, 1978. 296 p. (In Russ.)]
2. Дубянский М.А., Кенжебаев А., Степанов В.М., Асенов Г.А., Дубянская Л.Д. Прогнозирование эпизоотической активности чумы в Приарале и Кызылкумах. Нукус: Каракалпакстан, 1992. 240 с. [Dubyansky M.A., Kenzhebaev A., Stepanov V.M., Asenov G.A., Dubyanskaya L.D. Prediction of plague epizootic activity in the Aral Sea region and Kyzyl Kum. *Nukus: Karakalpakstan*, 1992. 240 p. (In Russ.)]
3. Евченко Ю.М., Ефременко Д.В., Кузнецова И.В., Мезенцев В.М., Белявцева Л.И., Платонов М.Е., Евсеева В.В., Дентовская С.В., Анисимов А.П., Куличенко А.Н. Изучение генетического разнообразия штаммов *Yersinia pestis* из Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы // Проблемы особо опасных инфекций. 2013. № 4. С. 51–55. [Evchenko Yu.M., Efremenko D.V., Kuznetsova I.V., Mezentsev V.M., Belyavtseva L.I., Platonov M.E., Evseeva V.V., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P., Kulichenko A.N. Studies of genetic diversity of *Yersinia pestis* strains isolated in Central-Caucasian high-mountain natural plague focus. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2013, no. 4, pp. 51–55. (In Russ.)]
4. Проценко С.Л., Сердюкова Т.В., Розанова Г.Н. Выявление новой плазмиды у пролинзависимых штаммов возбудителя чумы из Центрально-Кавказского природного очага и гетерогенность циркулирующих в нем штаммов по плазмидному составу. В кн.: Особо опасные инфекции на Кавказе. Ставрополь, 1987. 411 с. [Protsenko S.L., Serdyukova T.V., Rozanova G.N. Identification of a new plasmid in proline-dependent strains of the plague pathogen from the Central Caucasian Natural Focus and the heterogeneity of the strains circulating in it in terms of plasmid composition. In: *Particularly dangerous infections in the Caucasus. Stavropol*, 1987. 411 p. (In Russ.)]
5. Klevytska A.M., Price L.B., Schupp J.M., Worsham P.L., Wong J., Keim P. Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, vol. 39, no. 9, pp. 3179–3185.
6. Li Y., Cui Y., Cui B., Yan Y., Yang X., Wang H., Qi Z., Zhang Q., Xiao X., Guo Z., Ma C., Wang J., Song Y., Yang R. Features of variable number of tandem repeats in *Yersinia pestis* and the development of a hierarchical genotyping scheme. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 6: e66567. doi: 10.1371/journal.pone.0066567
7. Li Y., Cui Y., Hauck Y., Platonov M.E., Dai E., Song Y., Guo Z., Pourcel C., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P., Yang R., Vergnaud G. Genotyping and phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* by MLVA: insights into the worldwide expansion of Central Asia plague foci. *PLoS One*, 2009, vol. 4, no. 6: e6000. doi: 10.1371/journal.pone.0006000
8. Lowell J.L., Zhansarina A., Yockey B., Meka-Mechenko T., Stybayeva G., Atshabar B., Nekrassova L., Tashmetov R., Kenghebaeva K., Chu M.C., Kosoy M., Antolin M.F., Gage K.L. Phenotypic and molecular characterizations of *Yersinia pestis* isolates from Kazakhstan and adjacent regions. *Microbiology*, 2007, vol. 153, iss. 1, pp. 169–177.

### Авторы:

**Дубянский В.М.**, д.б.н., зав. отделом эпидемиологического мониторинга и прогнозирования ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

**Волынкина А.С.**, научный сотрудник лаборатории природно-очаговых инфекций ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

**Анисимов А.П.**, д.м.н., профессор, зам. директора по науке ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболensk, Московская область, Россия.

### Authors:

**Dubyanskiy V.M.**, PhD, MD (Biology), Head of Department of Epizootic Monitoring and Forecasting, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation;

**Volynkina A.S.**, Researcher of Laboratory of Natural Focal Infections, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation;

**Anisimov A.P.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director for Science, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 29.10.2018  
Принята к печати 11.05.2020

Received 29.10.2018  
Accepted 11.05.2020

# СОСТОЯНИЕ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ГАСТРИТАХ, АССОЦИИРОВАННЫХ С *HELICOBACTER PYLORI*-ИНФЕКЦИЕЙ, У МУЖЧИН СРЕДНЕГО ВОЗРАСТА

О.В. Смирнова<sup>1,2</sup>, А.А. Синяков<sup>1</sup>, Н.М. Титова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, Россия

<sup>2</sup> Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, Россия

**Резюме.** *Helicobacter pylori* — самый массовый патоген человека, уровень инфицированности которым взрослого населения достигает в развитых странах 20–40%, а в развивающихся странах — 80–90%. Многие авторы считают данную инфекцию основным фактором развития рака желудка. При *H. pylori*-инфекции свободнорадикальное окисление усиливается, что повышает в крови содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Гиперпродукция активных форм кислорода стимулирует свободнорадикальное ПОЛ, сопровождающееся деструкцией мембран, повреждением белков, липидов, ДНК. Таким образом, происходит разрушение внутриклеточных и наружных мембран, что приводит к гибели клеток. При заболеваниях, ассоциированных с *H. pylori*, выявляется дисрегуляция системы «ПОЛ — антиоксидантная защита (АОЗ)», которая способствует рассогласованности фаз регенерации и вызывает прогрессирование заболеваний. Целью нашей работы стало изучение показателей ПОЛ (диеновых конъюгатов [ДК], малонового диальдегида [МДА]) и АОЗ (ферментов супероксиддисмутазы, каталазы) при хроническом и хроническом атрофическом гастритах (ХГ и ХАГ), ассоциированных с *H. pylori*-инфекцией. У больных ХГ с *H. pylori*, ХАГ и ХАГ с *H. pylori* установлено увеличение содержания первичных (↑ДК) и конечных ТБК-активных продуктов ПОЛ (↑МДА). У больных ХГ с *H. pylori*, ХАГ и ХАГ с *H. pylori* происходило снижение активности супероксиддисмутазы, а у больных ХАГ и ХАГ с *H. pylori* дополнительно наблюдалось снижение активности каталазы (↓САТ). *H. pylori* лишь запускает механизмы генерации активных форм кислорода (АФК) клетками хозяина. Энергия окислительно-восстановительных реакций используется микроорганизмом для осуществления своих физиологических функций и составляет фактор патогенности самого микроорганизма: образующиеся в этих реакциях АФК могут оказывать повреждающее воздействие на структуры слизистой оболочки желудка (СОЖ). Кроме этого, изучение генетического кода *H. pylori* показало, что этот микроорганизм является носителем генов, кодирующих ферменты окислительного метаболизма, таких как СОД, каталаза, нитроредуктаза, флаводоксиноредуктаза. При длительной персистенции *H. pylori* в СОЖ и нарастании его биомассы он становится основным источником АФК, которые способны усиливать ПОЛ и вызывать повреждение мембранных структур и ДНК клеток эпителия желудка.

**Ключевые слова:** *Helicobacter pylori*, хронический гастрит, предраковые состояния желудка, свободнорадикальное окисление, активные формы кислорода.

## Адрес для переписки:

Смирнова Ольга Валентиновна  
660022, Россия, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3г,  
ФИЦ КНЦ СО РАН, обособленное подразделение  
НИИ медицинских проблем Севера.  
Тел./факс: 8 (913) 567-97-19.  
E-mail: ovsmirnova71@mail.ru

## Contacts:

Olga V. Smirnova  
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk, Partizana  
Zheleznyaka str., 3G, Scientific Research Institute  
of Medical Problems of the North.  
Phone/fax: +7 (913) 567-97-19.  
E-mail: ovsmirnova71@mail.ru

## Библиографическое описание:

Смирнова О.В., Синяков А.А., Титова Н.М. Состояние перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты при хронических гастритах, ассоциированных с *Helicobacter pylori*-инфекцией, у мужчин среднего возраста // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 4. С. 741–746. doi: 10.15789/2220-7619-TSO-1234

## Citation:

Smirnova O.V., Sinyakov A.A., Titova N.M. State of lipid peroxidation and antioxidant defense in chronic gastritis associated with *Helicobacter pylori*-infection in middle-aged males // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 4, pp. 741–746. doi: 10.15789/2220-7619-TSO-1234

## STATE OF LIPID PEROXIDATION AND ANTIOXIDANT DEFENSE IN CHRONIC GASTRITIS ASSOCIATED WITH *HELICOBACTER PYLORI*-INFECTION IN MIDDLE-AGED MALES

Smirnova O.V.<sup>a,b</sup>, Sinyakov A.A.<sup>a</sup>, Titova N.M.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center KSC SB RAS, Krasnoyarsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Abstract.** *Helicobacter pylori* is the most widespread human pathogen, with prevalence reaching up to 20–40% and 80–90% of adult infection in developed and developing countries, respectively. Many authors consider this infection as a major factor in the development of gastric cancer. In case of *H. pylori* infection, free homogeneous oxidation is augmented, that elevates the blood amount of POL products. Hyperproduction of reactive oxygen species stimulates free radical POL, accompanied by membrane destruction, damage to proteins, lipids, and DNA. Thus, the destruction of the intracellular and cell outer membranes occurs resulting in cell death. In diseases associated with *H. pylori* infection, there is a dysregulation of the lipid peroxidation system — antioxidant defense contributing to inconsistency in the regeneration phases triggering disease progression. The aim of our work was to study indicators of POL (diene conjugates, malonic dialdehyde) and antioxidant protection (AOP) (superoxide dismutase enzymes, catalase) in chronic gastritis and chronic atrophic gastritis associated with *H. pylori* infection. In patients with CG associated with *H. pylori* as well as CAG and CAG associated with *H. pylori* they were featured with increased amount of primary ( $\uparrow$ DC) and end TBA-active products of lipid peroxidation ( $\uparrow$ MDA), whereas activity of superoxide dismutase was decreased, additionally highlighted with reduced catalase activity ( $\downarrow$ CAT) in CAG and CAG associated with *H. pylori*. *H. pylori* just triggers the mechanisms of ROS generation in host cells. The energy of redox reactions is used by the microorganism to carry out its physiological functions and serves as a factor in its own pathogenicity, the ROS generated in such reactions can have a damaging effect on the structure of gastric mucosa. In addition, examining *H. pylori* genome has shown that it bears the genes encoding oxidative metabolism enzymes, such as SOD, catalase, nitroreductase, flavodoxin oxidoreductase. Long-term persistence of *H. pylori* in the gastric mucosa paralleled with its increased biomass accounts for it being the main source of ROS production able to augment lipid peroxidation and cause damage to the membrane structures and DNA of gastric epithelium cells.

**Key words:** *Helicobacter pylori*, chronic gastritis, precancerous conditions of the stomach, free radical oxidation, reactive oxygen species.

### Введение

На сегодняшний день изучение бактерии *Helicobacter pylori* остается одной из самых актуальных задач медицинской науки [5, 10]. *H. pylori* — самый массовый патоген человека, уровень инфицированности которым взрослого населения достигает в развитых странах 20–40%, а в развивающихся странах — 80–90% [7].

При *H. pylori*-инфекции свободнорадикальное окисление усиливается, что повышает в крови содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Гиперпродукция активных форм кислорода стимулирует свободнорадикальное ПОЛ, сопровождающееся деструкцией мембран, повреждением белков, липидов, ДНК. Таким образом, происходит разрушение внутриклеточных и наружных мембран, что приводит к гибели клеток. При заболеваниях, ассоциированных с *H. pylori*, выявляется дисрегуляция системы «ПОЛ — антиоксидантная защита (АОЗ)», которая способствует расстройству фаз регенерации и вызывает прогрессирование заболеваний. Целью нашей работы стало изучение показателей ПОЛ (диеновых конъюгатов, малонового диальдегида) и АОЗ (ферментов супероксиддисмутазы, каталазы) при хроническом и хроническом атрофическом гастритах (ХГ и ХАГ), ассоциированных с *H. pylori*-инфекцией.

### Материалы и методы

Исследование проводилось с разрешения этического комитета НИИ МПС ФИЦ КНЦ СО РАН. В работе с обследованными пациентами соблюдались этические принципы, предъявляемые ст. 24 Конституции РФ и Хельсинской декларацией Всемирной медицинской ассоциации. Каждый участник подписывал форму информированного согласия на обследование, подтверждающее его добровольное участие в исследовании.

В исследование были включены только мужчины среднего возраста (от 45 до 59 лет). Клиническое обследование мужчин, больных хроническим гастритом и хроническим атрофическим гастритом, осуществлялось в гастроэнтерологическом отделении НИИ МПС ФИЦ КНЦ СО РАН. Включение пациентов в исследование, взятие биологического материала проводилось при поступлении больных в стационар до начала терапии. Материалом исследования была венозная кровь, которая забиралась у больного утром, с 8 до 9 часов, натощак, из локтевой вены, в пробирки Vacutainer с разделительным гелем и двойным активатором свертывания (кремнеземом) и Vacutainer с раствором гепарина натрия (5 ЕД/мл).

Контрольная группа была сформирована из 63 мужчин среднего возраста (48,7 $\pm$ 3,9 лет)

без гастроэнтерологических жалоб и гастроэнтерологического анамнеза, без изменений СОЖ, с уровнем пепсиногена-1 в сыворотке крови более 50 мкг/л и соотношением пепсиноген-1/пепсиноген-2 более 3. В исследование не включались пациенты с ВИЧ-инфекцией, страдающие гепатитом, туберкулезом, с язвенной болезнью желудка, имеющие сопутствующие острые и хронические заболевания в фазе обострения. Также в исследования не включались пациенты, отказавшиеся принять участия в научном исследовании. Аналогичными были критерии исключения для пациентов 2–5 групп.

2 группа состояла из 58 пациентов мужского пола ( $46,3 \pm 1,9$  лет), страдающих хроническим гастритом. Диагноз устанавливался врачом гастроэнтерологом на основании эпидемиологических, клинических данных и был подтвержден нормальным содержанием пепсиногенов в сыворотке крови методом ИФА и воспалительными изменениями слизистой оболочки большой и малой кривизны тела желудка при фиброэзофагогастродуоденоскопии (ФЭГДС).

3 группа состояла из 61 пациента мужского пола ( $50,4 \pm 3,9$  лет), страдающих хроническим гастритом в сочетании *H. pylori*-инфекцией. Постановка диагноза, в отличие от группы 2, дополнялась обнаружением антител к *H. pylori*.

В 4 группу входили 28 больных мужского пола ( $51,2 \pm 4,9$  лет), страдающих хроническим атрофическим гастритом. Диагноз выставлен врачом гастроэнтерологом на основании эпидемиологических, клинических данных и подтвержден серологическим исследованием пепсиногенов методом ИФА и атрофическими изменениями слизистой оболочки большой и малой кривизны тела желудка с использованием модифицированной Сиднейской классификации при ФЭГДС. Диагноз выраженного атрофического гастрита слизистой оболочки тела желудка ставили при уровне пепсиногена-1 менее 25 мкг/л и значении отношения пепсиноген-1/пепсиноген-2 менее 3 с морфологическими признаками атрофических изменений СОЖ, полученной в результате прицельной биопсии. Легкой и средней степени атрофии тела желудка соответствовал уровень пепсиногена-1 от 25 до 50 мкг/л при отношении пепсиноген-1/пепсиноген-2 более 3 с морфологическими признаками атрофии СОЖ.

В 5 группу входили 26 больных мужского пола ( $49,1 \pm 4,4$  лет), страдающих хроническим атрофическим гастритом в сочетании *H. pylori*-инфекцией. Диагноз устанавливался на основании тех же критериев, что и в 4 группе, но дополнялся обнаружением антител к *H. pylori*.

Во всех группах наличие *H. pylori* выявляли методом ИФА с помощью определения титра специфических антител к антигену CagA

*H. pylori*. Титры антител от 30 EIU и более считали положительным результатом, менее 30 EIU — отрицательным результатом определения *H. pylori*.

*Определение содержания диеновых конъюгатов.* Метода основан на интенсивном поглощении конъюгированных диеновых структур гидроперекисей липидов в области 232 нм. Измерения производились на спектрофотометре СФ-56

Для расчета ДК использовался молярный коэффициент экстинкции:

$$K = 2,2 \times 10^5 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}.$$

Содержание диеновых конъюгатов выражали в мкмоль/л.

*Определение содержания малонового диальдегида.* В липидных системах в результате ПОЛ образуется малоновый диальдегид (МДА), взаимодействие которого с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) приводит к образованию хромогена с максимумом поглощения в красной области видимого спектра с длиной волны 532 нм. Расчет содержания МДА проводят с учетом коэффициента молярной экстинкции образовавшегося хромогена, равного  $1,56 \times 10^5 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ , и выражают в мкмоль/г Hb (если определение проводят в эритроцитах) или в мкмоль/л (если определение проводят в плазме):

$$C = \frac{D_{532} \times V_{p.c.} \times 1000}{V_{np} \times \varepsilon \times B \times d}.$$

*Определение активности супероксиддисмутазы.* Принцип метода основан на ингибировании реакции аутоокисления адреналина в щелочной среде в присутствии супероксиддисмутазы (СОД).

Об интенсивности аутоокисления адреналина судили по динамическому нарастанию поглощения при длине волны 347 нм, обусловленному накоплением продукта окисления, не описанного ранее в литературе, и опережающему по времени образованию адrenoхрома с максимумом поглощения при 480 нм [9].

$$\text{Ед. активности СОД} = \left( \frac{E_x - E_o}{E_x} \right) \times \frac{100\% \times F \times V \times 1000}{50 \times v \times d \times c},$$

где  $\left( \frac{E_x - E_o}{E_x} \right) \times \frac{100\%}{50}$  — единица активности на 1 мл плазмы.

Определение активности каталазы основано на образовании окрашенного в желтый цвет комплекса неразрушенной в ходе каталазной реакции перекиси водорода с молибдатом аммония. Активность каталазы рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{\frac{\Delta A}{c} \times V \times f}{t \times v \times d \times K \times Hb \times 60}.$$

По результатам исследования на персональном компьютере в пакете электронных таблиц MS Excel 2010 была сформирована база данных. Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакетов прикладных программ Statistica for Windows 8.0 (StatSoft Inc., США, 2008) и Microsoft Excel 2007 (Microsoft, США). Обработка полученных данных включала подсчет непараметрических данных: медианы (Me) и перцентилей ( $Q_{0,25}-Q_{0,75}$ ). Статистическую значимость различий определяли с использованием рангового критерия Манна–Уитни. Критический уровень значимости при проверки статистических гипотез принимался равным  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Были изучены концентрации первичных (диеновые конъюгаты) и конечных (малоновый диальдегид) продуктов липопероксидации, образующихся на различных этапах свободнорадикальной цепной реакции. Об активности антиоксидантной защиты судили по содержанию основных ее компонентов (СОД и каталазы).

В исследовании было обнаружено увеличение медианы ДК у больных ХГ с *H. pylori*, ХАГ и ХАГ с *H. pylori* в 2 раза относительно группы больных ХГ и контрольной группы ( $p_{1-3} = 0,04$ ;  $p_{2-3} = 0,047$ ;  $p_{1-4} = 0,03$ ;  $p_{2-4} = 0,03$ ;  $p_{1-5} = 0,03$ ;  $p_{2-5} = 0,03$ ). При свободнорадикальном окислении арахидоновой кислоты происходит отрыв водорода в  $\alpha$ -положении по отношению к двойной связи, приводящий к перемещению этой двойной связи с образованием ДК [3]. Диеновые конъюгаты — это первичные продукты ПОЛ, которые относятся к токсическим метаболитам, оказывающим повреждающее действие на липопротеиды, белки, ферменты и нуклеиновые кислоты. Медиана малонового диальдегида в плазме у больных ХГ с *H. pylori*, ХАГ и ХАГ с *H. pylori* возрастала в 1,2 раза по сравнению с группой больных ХГ и контрольной группой ( $p_{1-3} = 0,02$ ;  $p_{2-3} = 0,02$ ;  $p_{1-4} = 0,001$ ;  $p_{2-4} = 0,01$ ;  $p_{1-5} = 0,001$ ;  $p_{2-5} = 0,01$ ). Маркером процессов радикального окисления, запускаемых в клетках активными формами кислорода, является малоновый диальдегид, кроме того, это высокорекреационное соединение способное образовывать аддукты с белками, углеводами и нуклеиновыми кисло-

**Таблица. Показатели прооксидантной и антиоксидантной системы в плазме крови у больных хроническим гастритом (ХГ) и хроническим атрофическим гастритом (ХАГ) в сочетании с *H. pylori*-инфекцией и без нее относительно контрольной группы (Me,  $Q_{0,25}-Q_{0,75}$ ,  $p_{m-u}$ )**

Table. Indicators of prooxidant and antioxidant system in plasma in patients with chronic gastritis (CG) and chronic atrophic gastritis (CAG) without and in combination with *H. pylori* infection relative to the control group (Me,  $Q_{0,25}-Q_{0,75}$ ,  $p_{m-u}$ )

Показатели Indicators	Контрольная группа Control group N = (63) (1)		Больные ХГ без <i>H. pylori</i> Patients with CG without <i>H. pylori</i> N = 58 (2)		Больные ХГ с <i>H. pylori</i> Patients with CG with <i>H. pylori</i> N = 61 (3)		Больные ХАГ без <i>H. pylori</i> Patients with CAG without <i>H. pylori</i> N = 28 (4)		Больные ХАГ с <i>H. pylori</i> Patients with CAG with <i>H. pylori</i> N = 26 (5)	
	Me	$Q_{0,25}-Q_{0,75}$	Me	$Q_{0,25}-Q_{0,75}$	Me	$Q_{0,25}-Q_{0,75}$	Me	$Q_{0,25}-Q_{0,75}$	Me	$Q_{0,25}-Q_{0,75}$
ДК, мкмоль/л DC, $\mu\text{mol/l}$	1,15	0,88–1,38	1,21	1,88–2,3	2,4	1,24–2,1	2,6	1,5–2,41	2,7	1,5–2,41
					$p_{1-3} = 0,04$ $p_{2-3} = 0,047$		$p_{1-4} = 0,03$ $p_{2-4} = 0,03$		$p_{1-5} = 0,03$ $p_{2-5} = 0,03$	
МДА, мкмоль/1 г белка MDA, $\mu\text{mol/1 g}$ protein	1,6	0,96–2,24	1,7	0,92–2,24	2,1	1,42–2,8	2,24	1,48–3,08	2,32	1,9–3,5
					$p_{1-3} = 0,02$ $p_{2-3} = 0,02$		$p_{1-4} = 0,001$ $p_{2-4} = 0,01$		$p_{1-5} = 0,001$ $p_{2-5} = 0,01$	
СОД, ед/мин/1 г белка SOD, $\text{u/min/1 g}$ protein	204,41	151,05–250,3	209,4	133,5–232,2	187,6	141,6–223,3	179,5	161–219,8	177,5	164–220,4
					$p_{1-3} = 0,006$ $p_{2-3} = 0,004$		$p_{1-4} = 0,004$ $p_{2-4} = 0,003$		$p_{1-5} = 0,001$ $p_{2-5} = 0,005$	
КАТ, мкмоль/с/1 г белка CAT, $\mu\text{mol/s/1 g}$ protein	0,27	0,16–0,39	0,2	0,11–0,3	0,18	0,12–0,29	0,16	0,1–0,31	0,13	0,1–0,23
							$p_{1-4} = 0,03$ $p_{2-4} = 0,03$		$p_{1-5} = 0,03$ $p_{2-5} = 0,03$	

**Примечание.** Статистически значимые различия между группами больных:  $p_{1-2}$  — ХГ без *H. pylori* и контрольной группой;  $p_{1-3}$  — ХГ с *H. pylori* и контрольной группой;  $p_{1-4}$  — ХАГ без *H. pylori* и контрольной группой;  $p_{1-5}$  — ХАГ с *H. pylori* и контрольной группой;  $p_{2-3}$  — ХГ без *H. pylori* и ХГ с *H. pylori*;  $p_{2-4}$  — ХГ без *H. pylori* и ХАГ без *H. pylori*;  $p_{2-5}$  — ХГ без *H. pylori* и ХАГ с *H. pylori*;  $p_{3-4}$  — ХГ с *H. pylori* и гХАГ без *H. pylori*;  $p_{3-5}$  — ХГ с *H. pylori* и ХАГ с *H. pylori*;  $p_{4-5}$  — ХАГ без *H. pylori* и ХАГ с *H. pylori*.

Note. Statistically significant differences between the group of patients:  $p_{1-2}$  — with CG without *H. pylori* and the control group;  $p_{1-3}$  — with CG with *H. pylori* and the control group;  $p_{1-4}$  — with CAG without *H. pylori* and the control group;  $p_{1-5}$  — with CAG with *H. pylori* and the control group;  $p_{2-3}$  — with CG without *H. pylori* and with CG with *H. pylori*;  $p_{2-4}$  — with CG without *H. pylori* and with CAG without *H. pylori*;  $p_{2-5}$  — with CG without *H. pylori* and with CAG with *H. pylori*;  $p_{3-4}$  — with CG with *H. pylori* and with CAG without *H. pylori*;  $p_{3-5}$  — with CG with *H. pylori* and with CAG with *H. pylori*;  $p_{4-5}$  — with CAG without *H. pylori* and with CAG with *H. pylori*.

тами, приводя к потере их биологических активностей. В плазме крови субстратом для процесса перекисного окисления служат липидные компоненты, входящие в состав липопротеиновых частиц. Окисленные липопротеины плазмы крови вовлекаются в повреждение эндотелия кровеносных сосудов, способствуя развитию атеросклероза [6]. Повышенное содержание МДА в плазме свидетельствует об избыточной продукции АФК и не исключает значительного повреждения эндотелия кровеносных сосудов больных ХГ с *H. pylori*, ХАГ и ХАГ с *H. pylori*.

Далее была произведена оценка состояния системы АОЗ в группах больных. Было выявлено, что медиана значений СОД в плазме уменьшалась в 1,15 раза у больных ХГ с *H. pylori*, ХАГ и ХАГ с *H. pylori* относительно больных ХГ и контрольной группы ( $p_{1-3} = 0,006$ ;  $p_{2-3} = 0,004$ ;  $p_{1-4} = 0,004$ ;  $p_{2-4} = 0,003$ ;  $p_{1-5} = 0,001$ ;  $p_{2-5} = 0,005$ ). Многие авторы указывают, что СОД прерывает цепь свободно-радикальных процессов в начале своего зарождения на стадии одноэлектронного восстановления кислорода с образованием супероксидного анион-радикала [2]. В плазме крови работает экстрацеллюлярная изоформа СОД. Повышение ее активности может свидетельствовать об увеличении концентрации АФК в межклеточной жидкости или об избыточной продукции этого фермента клетками глии и фибробластами. Медиана каталазы в плазме понижалась у больных ХАГ и ХАГ с *H. pylori* относительно больных ХГ и контрольной группы (в 1,6 раз для  $p_{1-4} = 0,03$ ; в 1,2 раза для  $p_{2-4} = 0,03$ ; в 2 раза для  $p_{1-5} = 0,03$ ; в 1,5 раза для  $p_{2-5} = 0,03$ ). Высокий уровень активности каталазы позволяет предположить, что клетки, выстилающие кровеносные сосуды, подвергаются серьезному окислительному стрессу. Так как каталаза не имеет внеклеточной изоформы, в плазму крови она попадает вместе с клеточным содержанием в результате распада клеток и тканей. Пониженная активность ферментов СОД и каталазы при увеличенном содержании малонового диальдегида в плазме крови больных ХГ с *H. pylori*, ХАГ и ХАГ с *H. pylori* может свидетельствовать о напряжении в системе антиоксидантной защиты.

В настоящее время широко распространено мнение, что *H. pylori* лишь запускает механизмы генерации АФК клетками хозяина. Энергия окислительно-восстановительных реакций ис-

пользуется микроорганизмом для осуществления своих физиологических функций. Однако одновременно они составляют и фактор патогенности самого микроба, так как образующиеся в этих реакциях АФК могут оказывать повреждающее воздействие на структуры СОЖ [4]. Расшифровка генетического кода *H. pylori* показала, что этот микроорганизм является носителем генов, кодирующих ферменты окислительного метаболизма, таких как СОД, каталаза, нитроредуктаза, флаводоксиноредуктаза [8]. Мембранные структуры *H. pylori* являются источником образования АФК в СОЖ, при этом было подтверждено наличием в геноме *H. pylori* генов, кодирующих ферменты окислительного стресса. При длительной персистенции *H. pylori* в СОЖ и нарастании его биомассы он становится основным источником АФК, которые способны усиливать перекисное окисление липидов и вызывать повреждение мембранных структур и ДНК клеток эпителия желудка [3].

## Выводы

У больных ХГ с *H. pylori*, ХАГ и ХАГ с *H. pylori* установлено увеличение содержания первичных ( $\uparrow$ ДК) и конечных ТБК-активных продуктов перекисного окисления липидов ( $\uparrow$ МДА). У больных ХГ с *H. pylori*, ХАГ и ХАГ с *H. pylori* происходило снижение активности СОД, а у больных ХАГ и ХАГ с *H. pylori* дополнительно наблюдалось снижение активности каталазы ( $\downarrow$ САТ). При инфицировании *H. pylori* в организме пациента запускается локальная воспалительная реакция, которая инициирует усиление перекисного окисления липидов и способствует развитию дисфункции в системе АОЗ. В дальнейшем разрушение мембран клеток запускает появление морфологических изменений в слизистой оболочке желудка, появляется атрофия СОЖ, развивается хронический атрофический гастрит. Ранняя эрадикационная терапия против возбудителя *H. pylori* способствует нормализации ПОЛ – АОЗ систем. При ХАГ патогенетическая терапия должна быть направлена не только на очищение организма от *H. pylori*, но и на предотвращение гистодеструктивных изменений в СОЖ, а с учетом имеющегося дисбаланса в АОЗ системе не исключается назначение антиоксидантов для предотвращения всех описанных нарушений.

## Список литературы/References

1. Агеева Е.С., Штыгашева О.В., Рязанцева Н.В., Цуканов В.В. Молекулярно-генетические факторы, влияющие на исход инфицирования *Helicobacter pylori* у жителей Республики Хакасия // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2010. № 4. С. 16–21. [Ageeva E.S., Shtygasheva O.V., Ryazantseva N.V., Tsukanov V.V. Molecular genetic factors affecting the initial infection of *Helicobacter pylori* in residents of the Republic of Khakassia. *Rossiiskii zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii* = *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*, 2010, № 4, pp. 16–21. (In Russ.)]

2. Липатова Л.Ю., Дубинина Е.Е., Алексеева Д.В., Капустина Т.В., Лысенко И.С., Егорова Д.А., Леонова Н.В. Исследование состояния про- и антиоксидантной систем у больных эпилепсией и оценка возможностей болезнь-модифицирующей терапии // Сибирское медицинское обозрение. 2017. № 1 (103). С. 38–43. [Lipatova L.Yu., Dubinina E.E., Alekseeva D.V., Kapustina T.V., Lysenko I.S., Egorova D.A., Leonova N.V. Study of the state of pro- and antioxidant systems in patients with epilepsy and assessment of the possibilities of disease-modifying therapy. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie = Siberian Medical Review*, 2017, no. 1 (103), pp. 38–43. (In Russ.)]
3. Тузеева А.Ю., Долгова Д.Р., Абакумова Т.В., Сенина Д.Н. Изучение про- и антиоксидантного статуса эритроцитов при прогрессировании экспериментального рака яичников // Фундаментальные исследования. 2014. № 12-1. С. 145–149. [Tuzeeva A.Yu., Dolgova D.R., Abakumova T.V., Senina D.N. The study of pro- and antioxidant status of red blood cells during progression of experimental ovarian cancer. *Fundamental'nye issledovaniya = Fundamental Research*, 2014, no. 12-1, pp. 145–149. (In Russ.)]
4. Хомерики С.Г. Helicobacter pylori — индуктор и эффектор окислительного стресса в слизистой оболочке желудка: традиционные представления и новые данные // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2006. № 1. С. 37–46. [Khomeriki S.G. Helicobacter pylori — an inducer and effector of oxidative stress in the gastric mucosa: traditional concepts and new data. *Eksperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya = Experimental and Clinical Gastroenterology*, 2006, no. 1, pp. 37–46. (In Russ.)]
5. Blaser M.J. An endangered species in the stomach. *Sci. Am.*, 2005, vol. 292, no. 2, pp. 38–45. doi: 10.1038/scientificamerican0205-38
6. Calkin A., Tontonoz P. Liver X receptor signaling pathways and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2010, vol. 30, pp. 1513–1518. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.191197
7. Frenck R., Clemens J. Helicobacter in the developing world. *Microbes Infect.*, 2003, vol. 5, pp. 705–713. doi: 10.1016/s1286-4579(03)00112-6
8. Hughes N.J., Chalk P.A., Clayton C.L., Kelly D.J. Identification of carboxylation enzymes and characterization of a novel four-subunit pyruvate: flavodoxin oxidoreductase from Helicobacter pylori. *J. Bacteriol.*, 1995, vol. 177, pp. 3953–3959. doi: 10.1128/jb.177.14.3953-3959.1995
9. Jung O., Marklund S.L., Xia N., Busse R., Brandes R.P. Inactivation of extracellular superoxide dismutase contributes to the development of high-volume hypertension. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2007, pp. 470–477. doi: 10.1161/01.ATV.0000254823.15843.1f
10. 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. European Helicobacter and Microbiota Study Group and Consensus panel. Management of Helicobacter pylori infection — The Maastricht IV/Florence Consensus Report. *Gut*, 2012, vol. 61, pp. 646–664. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312288

**Авторы:**

**Смирнова О.В.**, д.м.н., доцент, зав. лабораторией клинической патофизиологии НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, Россия; профессор кафедры медицинской биологии Сибирского федерального университета, г. Красноярск, Россия;

**Синяков А.А.**, к.б.н., научный сотрудник лаборатории клинической патофизиологии НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, Россия;

**Титова Н.М.**, к.б.н., доцент, доцент кафедры медицинской биологии Сибирского федерального университета, г. Красноярск, Россия.

**Authors:**

**Smirnova O.V.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head of the Laboratory of Clinical Pathophysiology, Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center of the KSC SB RAS, Krasnoyarsk, Russian Federation; Professor of the Department of Medical Biology, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation;

**Sinyakov A.A.**, PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Clinical Pathophysiology, Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center of the KSC SB RAS, Krasnoyarsk, Russian Federation;

**Titova N.M.**, PhD (Biology), Associate Professor, Associate Professor of the Department of Medical Biology, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 24.06.2019  
Отправлена на доработку 11.05.2020  
Принята к печати 16.05.2020

Received 24.06.2019  
Revision received 11.05.2020  
Accepted 16.05.2020

# РОЛЬ ИНФЕКЦИОННОГО АГЕНТА В РАЗВИТИИ ПОРАЖЕНИЯ ЗУБОВ

А.В. Любимова<sup>1</sup>, Т.В. Бродина<sup>1</sup>, А.Е. Гончаров<sup>1</sup>, А.В. Силин<sup>1</sup>, Л.П. Зуева<sup>1</sup>,  
Е.А. Климова<sup>2</sup>, Л.В. Белова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Цель: оценить влияние колонизации полости рта штаммами *S. mutans* с различными генотипическими характеристиками на степень пораженности зубов у детей. **Материалы и методы.** В исследование были включены 274 ребенка в возрасте от 5 до 17 лет (153 девочки и 121 мальчик), которым проводился профилактический стоматологический осмотр. Степень пораженности зубов оценивалась по индексу КПУ (сумма кариозных, пломбированных, удаленных по причине кариеса зубов), согласно рекомендациям ВОЗ. Зубной налет собирался стерильными деревянными зубочистками с щечно-десневого края либо с фиссур первых моляров и помещался в 1,5 мл пробирки Eppendorf, затем проводился посев на среду Mitis Salivarius Agar (HiMedia, REF, Индия). Для дальнейшего изучения был отобран 481 штамм *S. mutans*. Выделение ДНК осуществлялось экспресс-методом. Амплификация выполнялась в термоциклере CFX-96 (Bio-Rad, США). Серотипирование проводилось методом мультиплекс-ПЦР. Анализ ПЦР-продуктов осуществлялся методом гель-электрофореза в 1,5% агарозном геле с окраской ДНК этидиумом бромида (10 мг/мл) производства Helicon (Москва) и визуализацией в УФ-лучах на трансиллюминаторе UVT1 производства Biokom. Генотипирование осуществлялось согласно методике (Saarela и соавт., 1996) олигонуклеотидным праймером OPA-02 (5'-TGCCGAGCTG-3'). Штаммы *S. mutans* были изучены на наличие следующих генов: *gtfB*, *spaP*, *cnm*, *fruA*, *gtfB*, *htrA*, *comE*, *mutA (I)*, *mutA (II)*, *mutA (III)*, *nlmAB (IV)*, *adcA*, *Smu.399*, *Smu.583*, *Smu.761*, *Smu.940c*, *Smu.1449*, *Smu.2130*. **Результаты.** *S. mutans* был выделен у всех обследованных детей. Поражение зубов выявлено у 82,4% детей. Среди изучаемых штаммов были обнаружены все 4 серотипа: у детей с индексом КПУ = 0 обнаруживались только серотипы k и f, доминирующим серотипом у детей с поражением зубов являлся с (74,7%). Были идентифицированы 19 генотипов *S. mutans*. У детей без кариеса (индекс КПУ = 0) *S. mutans* не содержали гены *spaP*, *comE*, *adcA*, *Smu.2130*, *smu1449*, *gtfB*, *htrA*. С увеличением индекса КПУ увеличивалась частота их обнаружения. Все 7 факторов вирулентности имели 9 генотипов *S. mutans*. При колонизации данными «вирулентными» генотипами у 94,9% детей отмечался высокий индекс КПУ. **Заключение.** Полученные данные свидетельствуют о том, что лишь отдельные штаммы обладают кариесогенным потенциалом. У детей с поражением зубов были выделены штаммы *S. mutans* серотипов e и c, имеющие сочетание генов вирулентности: *spaP*, *gtfB*, *comE*, *adcA*, *Smu.2130*, *Smu.1449*, *htrA*. Штаммы, не имеющие данных факторов, повреждений зубов не вызывали. Степень пораженности зубов увеличивается при колонизации несколькими генотипами с данным профилем факторов вирулентности.

**Ключевые слова:** *S. mutans*, генотипирование, серотипирование, гены вирулентности, поражение зубов, вирулентный потенциал.

## Адрес для переписки:

Любимова Анна Викторовна  
191015, Россия, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41,  
Северо-Западный государственный медицинский университет  
имени И.И. Мечникова.  
Тел.: 8 906 244-83-22.  
E-mail: lubimova@gmail.com

## Contacts:

Anna V. Liubimova  
191015, Russian Federation, St. Petersburg, Kirochnaya str., 41,  
North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov.  
Phone: +7 906 244-83-22.  
E-mail: lubimova@gmail.com

## Библиографическое описание:

Любимова А.В., Бродина Т.В., Гончаров А.Е., Силин А.В., Зуева Л.П.,  
Климова Е.А., Белова Л.В. Роль инфекционного агента в развитии  
поражения зубов // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 4. С. 747–754.  
doi: 10.15789/2220-7619-TRO-1138

## Citation:

Liubimova A.V., Brodina T.V., Goncharov A.E., Silin A.V., Zueva L.P.,  
Klimova E.A., Belova L.V. The role of infectious agent in development of tooth  
decay // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet,  
2020, vol. 10, no. 4, pp. 747–754. doi: 10.15789/2220-7619-TRO-1138

## THE ROLE OF INFECTIOUS AGENT IN DEVELOPMENT OF TOOTH DECAY

Liubimova A.V.<sup>a</sup>, Brodina T.V.<sup>a</sup>, Goncharov A.E.<sup>a</sup>, Silin A.V.<sup>a</sup>, Zueva L.P.<sup>a</sup>, Klimova E.A.<sup>b</sup>, Belova L.V.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** Aim: to assess the relationship between colonization of the oral cavity with *S. mutans* and different genotypic characteristics and the degree of tooth decay in children. *Materials and methods.* 274 children aged 5 to 17 years (153 girls and 121 boys) who received a preventive dental checkup were included in the study. The dental caries experience was assessed by the DMFT index (number of decayed, missing due to caries, and filled teeth), according to WHO recommendations. The plaque was collected with sterile wooden toothpicks from the buccal gingival margin or from fissures of the first molars and placed in 1.5 mL Eppendorf tubes, and then plated on Mitis Salivarius Agar medium (HiMedia, India). 481 strains of *S. mutans* were selected for further study. DNA was extracted by an express method. Amplification was performed in the CFX-96 thermal cycler (Bio-Rad, USA). Serotyping was performed by multiplex PCR. PCR products were analyzed by gel electrophoresis in 1.5% agarose gel with ethidium bromide (10 mg/mL) manufactured by Helicon, Moscow, and visualized in UV light in transilluminator UVT1 by Biokom. Genotyping was performed according to the methodology (Saarela et al., 1996) with the oligonucleotide primer OPA-02 (5'-TGCCGAGCTG-3'). Strains of *S. mutans* were studied for the presence of the following genes: *gtfB*, *spaP*, *cnm*, *fruA*, *gtfB*, *htrA*, *comE*, *mutA x(I)*, *mutA (II)*, *mutA (III)*, *nlmAB (IV)*, *adcA*, *Smu.399*, *Smu.583*, *Smu.761*, *Smu.940c*, *Smu.1449*, *Smu.2130*. *Results.* *S. mutans* was isolated from all the examined children. Dental decay was detected in 82.4% of the children. Among the strains studied, all 4 serotypes were found: in children with a DMFT = 0 only serotypes k and f were detected; the predominant serotype in children with tooth decay was serotype c (74.7%). 19 genotypes of *S. mutans* were identified. In children without caries (DMFT = 0), *S. mutans* did not contain the genes *spaP*, *comE*, *adcA*, *Smu.2130*, *Smu.1449*, *gtfB*, *htrA*. With the increase in the DMFT index, the frequency of their detection increased. 9 genotypes of *S. mutans* had all 7 virulence factors. In 94.9% of children colonized by these "virulent" genotypes, high DMFT index scores were observed. *Conclusion.* The data obtained indicate that only a limited number of specific strains have a cariogenic potential. Strains of *S. mutans* belonging to serotypes e and c with a combination of virulence genes *spaP*, *gtfB*, *comE*, *adcA*, *Smu.2130*, *Smu.1449*, and *htrA* were isolated from children with tooth decay. Strains without these factors did not cause any damage to the teeth. The degree of tooth decay increases with colonization by several genotypes with the combination of virulence factors described above.

**Key words:** *S. mutans*, genotyping, serotyping, virulence genes, tooth decay, virulent potential.

## Введение

Поражение зубов является одной из самых распространенных причин, ухудшающих качество жизни людей. На здоровье зубов влияет широкий спектр экзогенных и эндогенных факторов [1, 8, 16]. Наиболее обсуждаемым вопросом в настоящее время является роль микроорганизмов в развитии поражения зубов, в частности *S. mutans* [13, 14]. Было показано, что поражение зубов зависит не только от факта наличия *S. mutans* в зубном налете, но и от его концентрации [7, 17].

Повреждающий потенциал *S. mutans* зависит от ряда факторов вирулентности [9, 13]. К ним относятся: 1) способность метаболизировать углеводы с сопутствующей продукцией молочной кислоты (ацидогенность), толерантность к кислой среде (ацидофильность), возможность прикрепляться к гидроксиапатиту зубов (адгезивность), способность к формированию сложных полибактериальных структур в зубном налете (образование биопленок), устранение других штаммов бактерий за счет продукции бактериоцинов. Вирулентность *S. mutans* обусловлена экспрессией ряда генов. Так, например, ген *spaP* отвечает за адгезию к поверхности зубов. А ген *gfp* кодирует глюкансвязывающие белки, ко-

торые связывают образующие глюкозилтрансферазами глюканы, и способствуют адгезии и формированию биопленки. Если эти и некоторые другие факторы вирулентности фенотипически выражены штаммами *S. mutans* и работают скоординированно, то зубная биопленка приобретает прогрессивный повреждающий потенциал [2].

На сегодняшний день описано 52 генотипа и 4 серотипа (с, е, f, k) *S. mutans* [11, 18]. Некоторые исследования показывают, что не все штаммы *S. mutans* одинаково способны вызывать поражение зубов [10]. Однако данный вопрос остается недостаточно изученным.

Цель: оценить взаимосвязь между колонизацией полости рта штаммами *S. mutans* с различными генотипическими характеристиками и степенью пораженности зубов у детей.

## Материалы и методы

Сбор данных проводился на базах 3-го Стоматологического отделения СЗГМУ им. И.И. Мечникова и общеобразовательных школ № 369, № 291, № 547 Красносельского и № 76 Выборгского районов в период с сентября 2015 г. по июнь 2017 г. В данное исследование включены дети, родители (или законные представители)

которых были проинформированы о цели и методах исследования и дали письменное согласие на участие в данном исследовании и обработку персональных данных. Организация и проведение диссертационного исследования одобрены Комитетом по вопросам этики при ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова Минздрава России.

В исследование были включены 274 человека в возрасте от 5 до 17 лет (153 девочки и 121 мальчик), которым проводился профилактический осмотр. В процессе клинического обследования был оценен стоматологический статус каждого ребенка. Состояние зубов оценивали путем визуального осмотра с использованием плоских зеркал. Результат подтверждался обследованием с использованием стандартных диагностических процедур, согласно рекомендациям ВОЗ [12]. Поражения зуба на момент осмотра определяли по наличию следующих признаков: полость, размягчение эмали или разрыхление поверхности или стенки зуба. В случае сомнений в диагнозе, повреждение не регистрировалось. Для каждого ребенка был подсчитан индекс КПУ (сумма кариозных, пломбированных, удаленных по причине кариеса зубов) с учетом прикуса. Клиническое обследование проводилось двумя независимыми специалистами-стоматологами.

У каждого обследуемого осуществлялось взятие зубного налета для посева на питательные среды с целью дальнейшего выделения штаммов *S. mutans*. Взятие зубного налета производилось с любого из четырех постоянных первых моляров каждого исследуемого. Зубной налет собирался стерильными деревянными зубочистками, которыми проводили либо вдоль щечно-десневого края, либо по фиссуре первых моляров, на которых чаще всего возникает деструкция. Свободный конец каждой зубочистки отрезали, а отобранные образцы сразу помещали в 1,5 мл пробирки Eppendorf,

содержащие триптозно-соевый бульон 200 мкл с предварительно опущенным в него диском бацитрацина 0,04 ед.

Для обнаружения и выделения чистой культуры *S. mutans* неразведенные образцы через несколько часов после забора засеивались на селективную питательную среду для культивирования оральных стрептококков (Mitis Salivarius Agar, HiMedia, REF, Индия) методом истощающего штриха и инкубировались в термостате в условиях эксикатора при  $t = +37^{\circ}\text{C}$  в течение 48 ч. Колонии выросших микроорганизмов оценивались по морфологии, подозрительные на *S. mutans* пересевались до получения чистых культур и отдельных штаммов. С целью дальнейшего исследования из каждого образца были отобраны от 2 до 18 штаммов *S. mutans*, чтобы обеспечить достаточное количество изолятов для определения генотипического и серотипового разнообразия у одного исследуемого (всего 481 штамм).

Выделение ДНК штаммов *S. mutans* осуществлялось экспресс-методом. ДНК микроорганизмов выделялась при помощи набора химических реагентов в пробирках для экстракции ДНК из биопроб «ДНК-экспресс» производства НПФ «Литех», Москва. Перед использованием образцы геномной ДНК хранились при  $t = -20^{\circ}\text{C}$ .

Аmplification выполнялась в термоциклере CFX-96 (Bio-Rad, США) с последующей электрофоретической оценкой результатов реакции.

Серотипирование проводилось методом мультиплекс-ПЦР четырьмя парами олигонуклеотидных праймеров (табл. 1).

Анализ ПЦР-продуктов осуществлялся методом гель-электрофореза в 1,5% агарозном геле с окраской ДНК этидиумом бромидом (10 мг/мл) производства Helicon (Москва), и визуализацией в УФ-лучах на трансиллюминаторе UVT1 производства Biokom. В качестве стандарта для оценки длины полученных ампликонов использовали маркер длин фрагментов с шагом в 100 пар

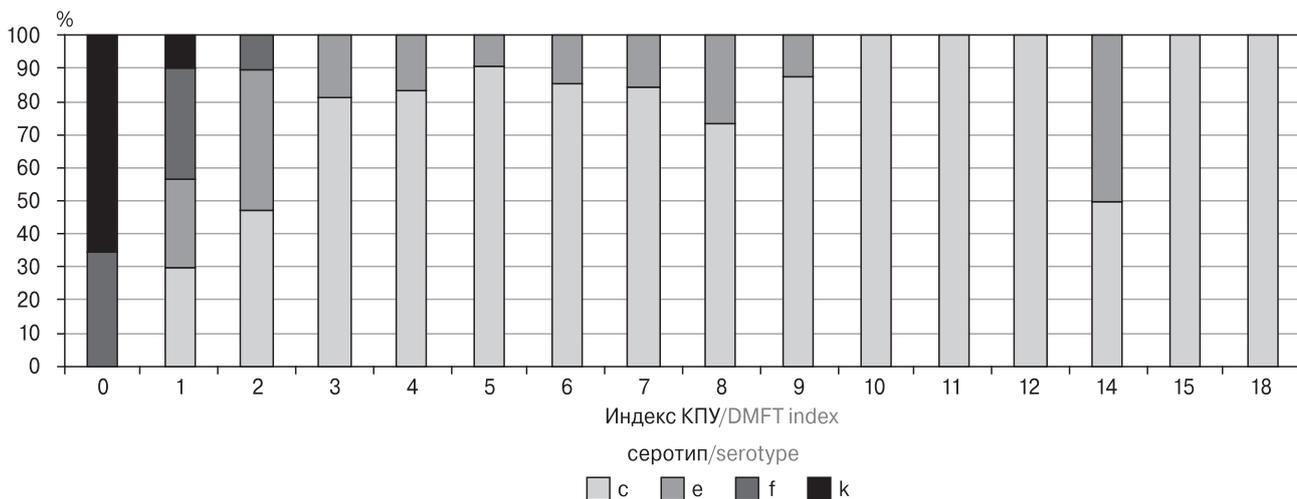
**Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры для серотипирования штаммов *S. mutans***

Table 1. Oligonucleotide primers for the serotyping of *S. mutans* strains

Серотип Serotype	Локус/ген Locus/gene	Олигонуклеотид/Oligonucleotide		Размер ампликона, п.н. Amplicon size, bp	Ссылка Reference
		Название Name	Последовательность 5'-3' The sequence 5'-3'		
c	<i>rgpF-ORF12</i>	SC-F	CGGAGTGCTTTTACAAGTGCTGG	727	2
		SC-R	AACCACGGCCAGCAAACCCTTAT		
e	<i>rgpF-ORF12</i>	SE-F	CCTGCTTTTCAAGTACCTTTTCGCC	517	2
		SE-R	CTGCTTGCCAAGCCCTACTAGAAA		
f	<i>rgpF-ORF12</i>	SF-F	CCCACAATTGGCTTCAAGAGGAGA	316	2
		SF-R	TGCGAAACCATAAGCATAGCGAGG		
k	<i>rgpF</i>	CEFK-F	ATCCCCGCCGTTGGACCATTC	294	3
		K-R	CCAATGTGATTCATCCCATCAC		

**Примечание.** \**rgpF-ORF12* — ген, расположенный на переменном участке у штаммов серотипов c, e, f между *rgpF* и ORF12.

Note. \**rgpF-ORF12* — gene located on the variable region of strains of serotypes c, e, f between *rgpF* and ORF12.



**Рисунок 1. Распределение *S. mutans* разных серотипов у детей с различной степенью пораженности зубов**

Figure 1. Distribution of *S. mutans* of different serotypes in children with varying degrees of tooth decay

нуклеотидов производства НПО «СибЭнзим» (8 мкл маркера на дорожку). Электрофорез осуществлялся при помощи источника питания для электрофореза нуклеиновых кислот в агарозных и акриламидных гелях «Эльф-4» и «Эльф-8». Параметры электрофореза: 180 В, 19,0 Вт, 180 мА в течение 25 мин.

Генотипирование штаммов *S. mutans* осуществлялось согласно методике Saarela и соавт. (1996) олигонуклеотидным праймером ОРА-02 (5'-TGCCGAGCTG-3'). Для оценки полученных ПЦР-профилей использовался электрофоретический метод с последующей УФ-визуализацией.

Также нами был изучен набор некоторых генов вирулентности *S. mutans*, для этого было проанализировано распределение генов вирулентности методом ПЦР. Рассматривались гены, отвечающие за адгезию (*gtfB*, *spaP*, *cnm*), ацидогенность (*fruA*, *gtfB*), ацидофильность (*htrA*), способность образовывать биопленки (*comE*) и производить бактериоцины/мутацины [*mutA* (I), *mutA* (II), *mutA* (III), *nlmAB* (IV)]. В исследование также включено определение других предполагаемых генов вирулентности, кодирующих поверхностный адгезин/Zn-зависимый липопротеин (*adcA*), С3-деградирующую протеиназу (*Smu.399*), гемолизин (*Smu.583*), коллагеназу (*Smu.761*), гемолизин III (*Smu.940c*), фибронектин/фибриноген-зависимый белок (*Smu.1449*), эксфолиативный токсин (*Smu.2130*).

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы Epi Info (версия 3.5.1). Анализ влияния предполагаемых факторов риска осуществлялся в исследовании «случай–контроль» с оценкой показателя отношения шансов (ОШ) с 95% доверительными интервалами. Критерием статистической значимости полученных результатов считали величину  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

*S. mutans* был выделен у всех обследованных детей. Поражение зубов выявлено у 82,4% детей. Среди изученных штаммов были обнаружены все известные 4 серотипа с, е, f и k. От каждого ребенка были выделены штаммы *S. mutans* только одного серотипа. В общей популяции детей преобладал *S. mutans* серотипа с (61,1%), доля других серотипов составляла от 10,5 до 15,6%. Преобладание серотипа с в общей структуре согласуется с данными других исследований, в которых частота его встречаемости колебалась от 60 до 80% [4, 11, 15].

Разные серотипы *S. mutans* с разной частотой были обнаружены у детей с различной степенью пораженности кариесом зубов. У детей с индексом КПУ = 0 (абсолютно здоровые зубы) обнаруживались только серотипы k и f; все четыре серотипа были выявлены у детей с индексом КПУ = 1; у детей с индексом КПУ = 2 уже в 90% случаев были обнаружены серотипы е и с и только в 10% — серотип f, у всех остальных детей с индексом КПУ более двух обнаружены только е- и с-серотипы с преобладанием серотипа с (рис. 1).

Таким образом, *S. mutans* серотипа с в основном обнаруживались у детей с поражением зубов (74,7%). Серотип с достоверно чаще встречался в группе детей с КПУ+кпу = 6–18 (ОШ = 41,9, 95%, ДИ = 16,8–104,3) ( $p < 0,001$ ) и КПУ+кпу = 2–5 (ОШ = 28,8, 95%, ДИ = 12,6–66,0) ( $p < 0,001$ ) по сравнению с детьми с КПУ 0–1.

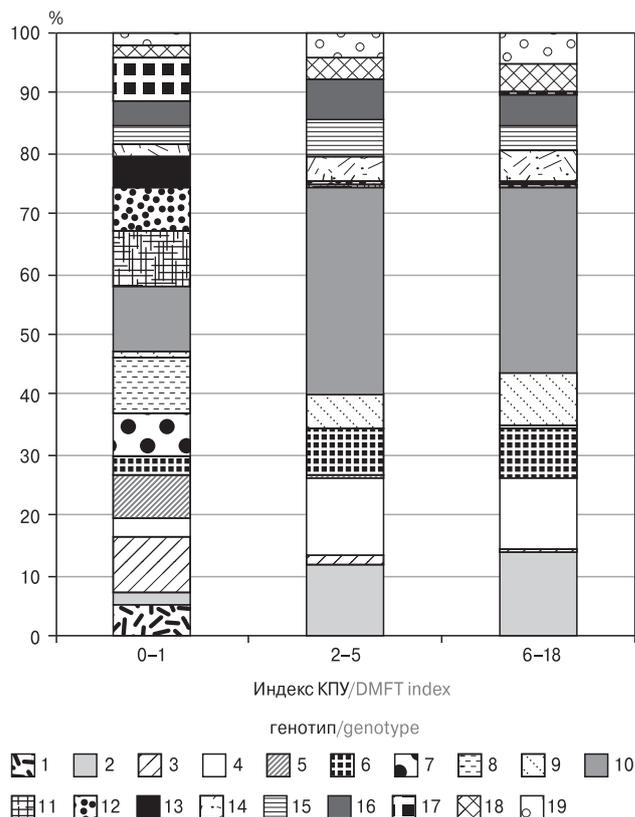
Девятнадцать генотипов были идентифицированы среди 598 изолятов, выделенных от 274 детей. Анализ общности генотипов *S. mutans* выявил, что в популяции случайно отобранных детей доминирует циркуляция не-

скольких генотипов. Самым распространенным являлся 10 генотип, который был выявлен у 173 из 274 (62,9%) детей и составлял 28,9% от всех изолятов *S. mutans*. Чаше остальных встречались также 2, 4, 6 и 9 генотипы, которые были выявлены у 24,4; 23,6; 15,6 и 13,5% детей соответственно.

Данное исследование показало, что генетическое разнообразие *S. mutans* имеет прямую положительную связь с распространенностью кариеса зубов. Обращает на себя внимание то, что уже в группе детей с индексом КПУ = 2–5 генотипический состав *S. mutans* резко отличался от такового в группе детей с индексом КПУ = 0–1 и с ростом его значения практически не изменялся (рис. 2).

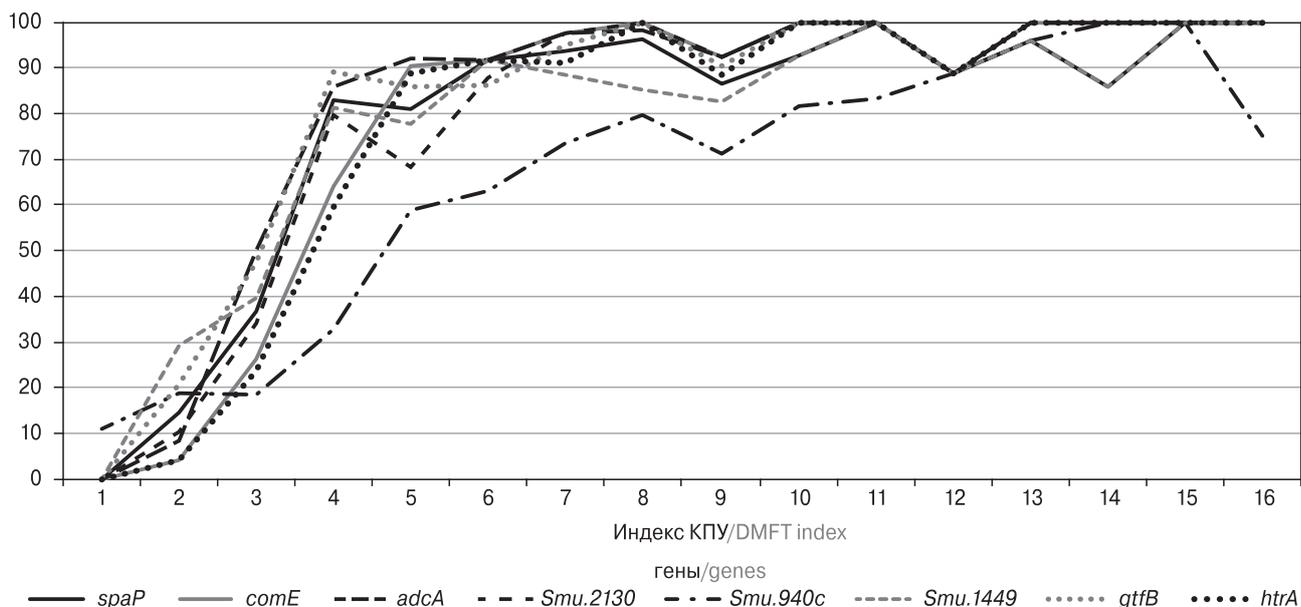
Результаты исследования позволяют предположить, что доминирующие генотипы и/или определенные сочетания конкретных генотипов *S. mutans* были связаны с развитием поврежденных зубов. Аналогичные выводы были сделаны в исследовании Vottner A. и соавт., в котором было показано, что у большинства обследованных детей с ранним тяжелым поражением зубов был обнаружен один доминирующий генотип *S. mutans* [3].

При анализе наличия генов вирулентности у штаммов *S. mutans*, которыми были колонизированы дети, имеющие различный индекс КПУ, было выявлено, что у детей без кариеса (индекс КПУ = 0) *S. mutans* не имели следующих генов вирулентности: *spaP*, *comE*, *adcA*, *Smu.2130*, *Smu.1449*, *gtfB*, *htrA* (рис. 3).



**Рисунок 2. Характеристика разнообразия генотипов *S. mutans* в группах с различной степенью поражения зубов**

Figure 2. Characteristics of diversity of *S. mutans* genotypes in groups with varying degrees of tooth decay



**Рисунок 3. Частота обнаружения генов, кодирующих факторы вирулентности у штаммов *S. mutans*, выделенных от детей с различной степенью пораженности зубов**

Figure 3. Frequency of detection of genes encoding virulence factors in *S. mutans* strains isolated from children with different degrees of tooth decay

**Таблица 2. Частота обнаружения генов, кодирующих факторы вирулентности, у различных генотипов штаммов *S. mutans***

Table 2. The frequency of detection of genes encoding virulence factors in different genotypes of *S. mutans* strains

Генотип Genotype	<i>spaP</i>	<i>comE</i>	<i>fruA</i>	<i>adca</i>	<i>Smu.761</i>	<i>Smu.583</i>	<i>Smu.2130</i>	<i>Smu.399</i>	<i>Smu.940 c</i>	<i>Smu.1449</i>	<i>gtfB</i>	<i>mutA (I)</i>	<i>mutA (II)</i>	<i>mutA (III)</i>	<i>nmlAB (IV)</i>	<i>cnm</i>	<i>htrA</i>
2	91	81	0	88	70	93	73	57	64	93	81	0	0	0	0	0	84
4	88	95	0	92	91	45	89	69	86	86	97	0	74	0	0	0	82
6	86	88	0	81	84	77	86	0	88	84	93	0	0	0	60	0	91
9	81	92	0	95	70	65	89	0	62	92	70	0	0	0	0	0	84
10	97	82	0	94	88	81	84	65	62	95	99	0	62	0	0	0	82
3	0	0	85	0	69	0	0	0	0	0	0	46	92	0	0	85	0
5	0	0	100	0	75	0	0	63	0	0	0	0	0	100	88	88	0
7	0	0	86	0	0	0	0	71	0	0	0	100	100	0	100	86	0
8	0	0	80	0	0	0	0	0	50	0	0	0	0	90	0	50	0
11	0	0	100	0	0	70	0	0	0	0	0	80	0	60	0	70	0
12	0	0	70	0	0	0	0	0	60	0	0	0	70	100	0	0	0
13	0	0	71	0	71	71	0	0	0	0	0	71	0	0	86	71	0
14	84	92	0	80	0	64	88	68	72	92	76	0	0	0	64	0	84
15	93	82	0	96	64	0	82	0	68	54	89	0	75	0	0	0	100
16	68	88	0	85	76	56	82	0	0	65	62	0	0	0	0	0	71
17	0	0	100	0	0	0	0	0	50	0	0	88	0	88	100	88	0
18	74	61	0	65	0	0	96	0	0	83	87	0	0	0	0	0	70
19	0	64	0	72	0	56	68	52	64	0	76	0	0	0	0	0	60

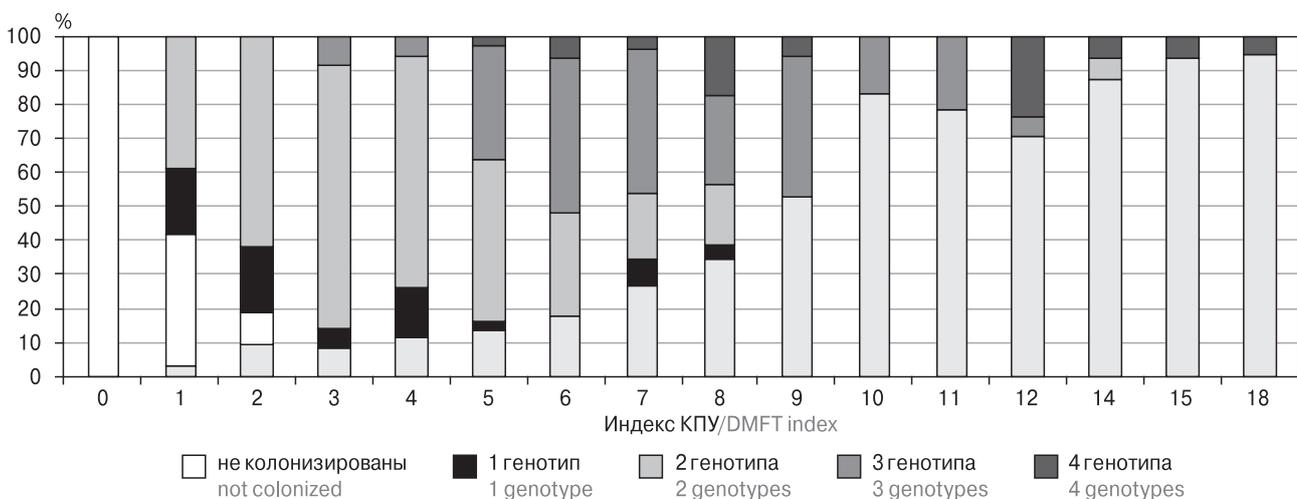
По мере увеличения индекса КПУ частота выявления данных генов прогрессивно увеличивалась.

При анализе распределения генов вирулентности среди различных генотипов *S. mutans* было выявлено, что все 7 факторов вирулентности имели 9 генотипов *S. mutans*: генотипы 2, 4, 6, 9, 10, 14, 15, 16, 18 (табл. 2).

При колонизации данными «вирулентными» генотипами у 94,9% детей было выявлено поражение зубов.

Степень пораженности зубов увеличивалась при колонизации несколькими генотипами с данным профилем факторов вирулентности (рис. 4).

Если ребенок имел более одного генотипа *S. mutans*, это приводило к развитию кариеса зубов ( $\chi^2$  Мантеля–Гензеля = 102,2, 95%;  $p < 0,001$ ) в группе с КПУ+кпу = 6–18 и (ОШ = 124,3, 95% ДИ = 35,2–438,8;  $p < 0,001$ ) с КПУ+кпу = 2–5. В группе «контролей» (КПУ+кпу = 0–1) не было выявлено детей с 3 и 4 генотипами *S. mutans*, в отличие от других групп. В другом



**Рисунок 4. Удельный вес колонизации детей несколькими «вирулентными» генотипами *S. mutans* в зависимости от степени пораженности зубов**

Figure 4. Specific weight of colonization of children by several “virulent” genotypes of *S. mutans*, depending on the degree of tooth damage

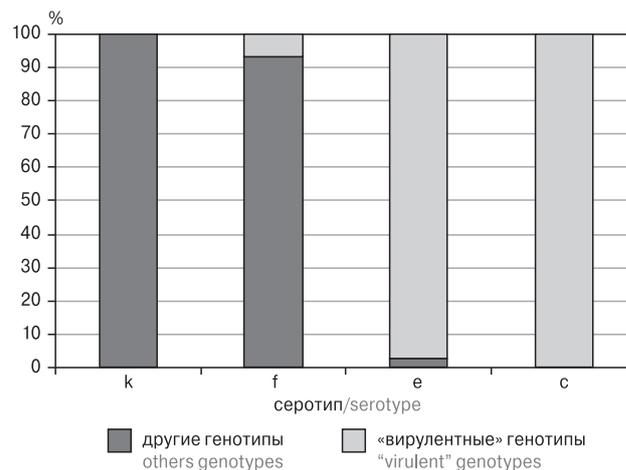
исследовании при сравнении количества генотипов до и после пломбирования зубов было выявлено от 2 до 3 разных генотипов *S. mutans* до пломбирования, тогда как после пломбирования — от 1 до 2 [6]. Это может свидетельствовать о том, что тяжелое поражение зубов не только связано с колонизацией несколькими генотипами, но и может приводить к увеличению ее степени. Последнее подтверждается данными исследования Cheon K. и соавт., в котором было показано, что меньшее количество разрушенных поверхностей зубов в значительной степени связано с меньшим разнообразием и более высокой стабильностью генотипов *S. mutans* [5].

Анализ распределения «вирулентных» и «невирулентных» генотипов среди различных серотипов *S. mutans* показал, что «вирулентные» генотипы были в основном среди серотипов е и с, а «невирулентные» — среди к и f (рис. 5).

Кроме того, «вирулентные» штаммы обнаруживались в основном в составе ассоциаций друг с другом (99,2%), тогда как 75,6% «невирулентных» штаммов были выделены в монокультуре, что составило 93,6% от всех монокультур.

## Заключение

Полученные данные свидетельствуют о том, что лишь отдельные штаммы обладают кариесогенным потенциалом из-за генерации у них генов вирулентности. У детей с поражением зубов были выделены штаммы *S. mutans* серотипов е и с, имеющие сочетание генов вирулентности: *spaP*, *gtf B* (адгезия), *comE* (образование



**Рисунок 5. Частота обнаружения «вирулентных» генотипов среди различных серотипов *S. mutans***

Figure 5. Frequency of detection of “virulent” genotypes among various serotypes of *S. mutans*

биопленок), *adcA* (поверхностный адгезин/*Zn*-зависимый липопротеин), *Smu.2130* (экзофолиативный токсин), *Smu.1449* (фибронектин/фибриноген-зависимый белок), *htrA* (ацидофильность). Штаммы, не имеющие данных факторов, повреждений зубов не вызывали. Степень пораженности зубов увеличивается при колонизации несколькими генотипами с данным профилем факторов вирулентности. Разработка бактериофагов к вирулентным штаммам *S. mutans* может явиться ключевым моментом в профилактике поражения зубов.

## Список литературы/References

- Скрипкина Г.И. Комплексный подход к возможности прогнозирования кариозного процесса в детском возрасте на донозологическом этапе развития заболевания // *Стоматология для всех*. 2011. № 2. С. 34–38. [Scripkina G.I. Comprehensive approach to the opportunity of carious process prognostication in childhood at prenosologic stage of disease development. *Stomatologiya dlya vsekh = Stomatology for All*, 2011, no. 2, pp. 34–38. (In Russ.)]
- Argimón S., Caufield P.W. Distribution of putative virulence genes in *Streptococcus mutans* strains does not correlate with caries experience. *J. Clin. Microbiol.*, 2011, vol. 49, no. 3, pp. 982–984. doi: 10.1128/JCM.01993-10
- Bottner A., He R.Y., Sarbu A., Nainar S.M.H., Dufour D., Gong S.G., Lévesque C.M. *Streptococcus mutans* isolated from children with severe-early childhood caries form higher levels of persisters. *Arch. Oral Biol.*, 2020, vol. 110: 104601. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.104601
- Carletto-Körber F.P., González-Ittig R.E., Jimenez M.G., Cornejo L.S. Serotype diversity of *Streptococcus mutans* and caries activity in children in Argentina. *Eur. J. Paediatr. Dent.*, 2015, vol. 16, no. 3, pp. 177–180.
- Cheon K., Moser S.A., Wiener H.W., Whiddon J., Momeni S.S., Ruby J.D., Cutter G.R., Childers N.K. Characteristics of *Streptococcus mutans* genotypes and dental caries in children. *Eur. J. Oral Sci.*, 2013, vol. 121, no. 3, pt. 1, pp. 148–155. doi: 10.1111/eos.12044
- Damé-Teixeira N., Arthur R.A., Parolo C.C., Maltz M. Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* isolated from carious dentin after partial caries removal and sealing. *ScientificWorldJournal*, 2014, vol. 21: 165201. doi: 10.1155/2014/165201
- Fan C.C., Wang W.H., Xu T., Zheng S.G. Risk factors of early childhood caries (ECC) among children in Beijing — a prospective cohort study. *BMC Oral Health*, 2019, vol. 19, no. 1, p. 34. doi: 10.1186/s12903-019-0721-9
- Gomes M.C., Pinto-Sarmiento T.C., Costa E.M., Martins C.C., Granville-Garcia A.F., Paiva S.M. Impact of oral health conditions on the quality of life of preschool children and their families: a cross-sectional study. *Health Qual. Life Outcomes*, 2014, no. 12, pp. 55–63. doi: 10.1186/1477-7525-12-55
- Kreth J., Merritt J., Zhu L., Shi W., Qi F. Cell density- and ComE-dependent expression of a group of mutacins and mutacin-like gene in *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2006, vol. 265, no. 1, pp. 11–17. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00459.x

10. Lembo F.L., Longo P.L., Ota-Tsuzuki C., Rodrigues C.R., Mayer M.P. Genotypic and phenotypic analysis of Streptococcus mutans from different oral cavity sites of caries-free and caries-active children. *Oral Microbiol. Immunol.*, 2007, vol. 22, no. 5, pp. 313–319. doi: 10.1111/j.1399-302X.2007.00361.x
11. Nakano K., Ooshima T. Serotype classification of Streptococcus mutans and its detection outside the oral cavity. *Future Microbiol.*, 2009, vol. 4, no. 7, pp. 891–902. doi: 10.2217/fmb.09.64
12. Oral Health Survey. Basic methods; 5<sup>th</sup> ed. Geneva: World Health Organization, 2013. 70 p.
13. Palmer E.A., Nielsen T., Peirano P., Nguyen A.T., Vo A., Nguyen A., Jackson S., Finlayson T., Sauerwein R., Marsh K., Edwards I., Wilmot B., Engle J., Peterson J., Maier T., Machida C.A. Children with severe early childhood caries: pilot study examining mutans streptococci genotypic strains after full-mouth caries restorative therapy. *Pediatr. Dent.*, 2012, vol. 34, no. 2, pp. 1–10.
14. Palmer E.A., Vo A., Hiles S.B., Peirano P., Chaudhry S., Trevor A., Kasimi I., Pollard J., Kyles C., Leo M., Wilmot B., Engle J., Peterson J., Maier T., Machida C.A. Mutans streptococci genetic strains in children with severe early childhood caries: follow-up study at one-year post-dental rehabilitation therapy. *J. Oral Microbiol.*, 2012, no. 4, pp. 167–173. doi: 10.3402/jom.v4i0.19530
15. Rincón-Rodríguez R.J., Parada-Sánchez M.T., Bedoya-Correa C.M., Arboleda-Toro D. Genetic diversity of Streptococcus mutans serotype c isolated from white spot and cavitated caries lesions from schoolchildren. *Arch. Oral Biol.*, 2019, vol. 100, pp. 33–41. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.02.003
16. Struzycka I. The oral microbiome in dental caries. *Pol. J. Microbiol.*, 2014, vol. 63, no. 2, pp. 127–135.
17. Suzuki S., Ukiya T., Kawachi Y., Ishii H., Sugihara N. Decision tree analysis for factors associated with dental caries in school-aged children in Japan. *Community Dent. Health.*, 2018, vol. 35, no. 4, pp. 247–251. doi: 10.1922/CDH\_4409Suzuki05
18. Zhou Q., Qin X., Qin M., Ge L. Genotypic diversity of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus in 3–4-year-old children with severe caries or without caries. *Int. J. Paediatr. Dent.*, 2011, vol. 21, no. 6, pp. 422–431. doi: 10.1111/j.1365-263X.2011.01145.x

**Авторы:**

**Любимова А.В.**, д.м.н., доцент, профессор кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет (СЗГМУ) имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

**Бродина Т.В.**, аспирант кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

**Гончаров А.Е.**, д.м.н., доцент кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

**Силин А.В.**, д.м.н., профессор кафедры стоматологии общей практики ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

**Зуева Л.П.**, д.м.н., профессор, зав. кафедрой эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

**Климова Е.А.**, детский стоматолог, аспирант кафедры детской стоматологии ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

**Белова Л.В.**, д.м.н., профессор кафедры профилактической медицины и охраны здоровья ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

**Authors:**

**Liubimova A.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor of Epidemiology Department, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

**Brodina T.V.**, PhD Student, Epidemiology Department, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

**Goncharov A.E.**, PhD, MD (Medicine), Assistant Professor, Epidemiology Department, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

**Silin A.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor of the Department of General Practice Dentistry, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

**Zueva L.P.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Epidemiology Department of North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

**Klimova E.A.**, Children's Dentist, PhD Student, Department of Pediatric Dentistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;

**Belova L.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor of the Department of Preventive Medicine and Health, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 23.01.2019  
Отправлена на доработку 14.02.2020  
Принята к печати 14.09.2020

Received 23.01.2019  
Revision received 14.02.2020  
Accepted 14.09.2020

# ИНФОРМАТИВНОСТЬ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ В ДИАГНОСТИКЕ И РАЗВИТИИ ЗАКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМЫ В ПОЖИЛОМ ВОЗРАСТЕ

А.М. Чухраев<sup>1</sup>, Н.М. Агарков<sup>2,3</sup>, Д.А. Коняев<sup>4</sup>, Е.В. Попова<sup>4</sup>, М.М. Яблоков<sup>4</sup>,  
А.С. Кулабухов<sup>5</sup>

<sup>1</sup> ФГУ МНТК «Микрохирургия глаза им. акад. С.Н. Федорова», Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО Юго-Западный государственный университет, г. Курск, Россия

<sup>3</sup> ФГАОУ ВО Белгородский государственный национальный исследовательский университет, г. Белгород, Россия

<sup>4</sup> Тамбовский филиал МНТК «Микрохирургия глаза им. акад. С.Н. Федорова», г. Тамбов, Россия

<sup>5</sup> ФГБОУ ВО Курский государственный медицинский университет, г. Курск, Россия

**Резюме.** Увеличение доли пожилых людей в структуре современного общества, наряду с другими причинами и факторами риска, сопровождается ростом заболеваемости глаукомой. Согласно международным исследованиям в мире к 2020 г. прогнозируется увеличение больных глаукомой до 80 млн. Среди лиц пожилого возраста глаукома является распространенной патологией, развитие которой ассоциируется с местными нарушениями интерлейкинового профиля. Однако особенности последнего у больных с первичной закрытоугольной глаукомой в пожилом возрасте практически не изучены. Исследования локального интерлейкинового статуса проведены в основном у пациентов с подозрением или начальными проявлениями первичной открытоугольной глаукомы. Особенности сдвигов интерлейкинов в слезной жидкости в целенаправленной группе пожилых больных, страдающих первичной закрытоугольной глаукомой II стадии, практически не анализировались. Кроме того, спектр местных интерлейкинов у пациентов с обсуждаемой патологией в ранее выполненных исследованиях являлся ограниченным. Не проводилось также определение информативности интерлейкинов слезной жидкости у пожилых пациентов с глаукомой с учетом объективных методов. Цель настоящей работы — выявление особенностей и информативности показателей локального интерлейкинового профиля у пожилых больных с первичной закрытоугольной глаукомой. Обследованы 58 больных с первичной закрытоугольной глаукомой II стадии в возрасте 60–74 года (основная группа) и 27 пожилых людей аналогичного возраста без данной патологии. Содержание интерлейкинов в слезной жидкости определяли иммуноферментным анализатором «Multiscan» (Финляндия) посредством метода сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа с применением тест-систем «R&D Diagnostic Inc.» (США). Информативность интерлейкинов рассчитывалась по общепринятой формуле. Особенности местного интерлейкинового профиля больных первичной закрытоугольной глаукомой пожилого возраста являются повышенный уровень в слезной жидкости противовоспалительных IL-2, IL-17, IL-8 и снижение продукции противовоспалительных IL-10. Указанные локальные интерлейкины

---

**Адрес для переписки:**

Агарков Николай Михайлович  
305040, Россия, г. Курск, ул. 50 лет Октября, 94,  
ФГБОУ ВО Юго-Западный государственный университет.  
Тел.: 8 910 740-96-13.  
E-mail: vitalaxen@mail.ru

**Contacts:**

Nikolai M. Agarkov  
305040, Russian Federation, Kursk, 50 Let Oktyabrya str., 94,  
South-West State University.  
Phone: +7 910 740-96-13.  
E-mail: ufalab@mail.ru

**Библиографическое описание:**

Чухраев А.М., Агарков Н.М., Коняев Д.А., Попова Е.В., Яблоков М.М.,  
Кулабухов А.С. Информативность интерлейкинов слезной жидкости  
в диагностике и развитии закрытоугольной глаукомы в пожилом  
возрасте // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 4. С. 755–761.  
doi: 10.15789/2220-7619-IIT-1247

**Citation:**

Chukhraev A.M., Agarkov N.M., Konyaev D.A., Popova E.V., Yablokov M.M.,  
Kulabukhov A.S. Informativity lacrimal fluid interleukins in diagnostics and  
development of angle-closure glaucoma in elderly subjects // Russian  
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10,  
no. 4, pp. 755–761. doi: 10.15789/2220-7619-IIT-1247

обладают наибольшей информативностью, что имеет научно-практическое значение для выделения новых механизмов развития, диагностики и обоснования селективной иммуноотропной терапии рассматриваемой патологии.

**Ключевые слова:** интерлейкины, иммунопатология, закрытоугольная глаукома, пожилые пациенты, слезная жидкость.

## INFORMATIVITY LACRIMAL FLUID INTERLEUKINS IN DIAGNOSTICS AND DEVELOPMENT OF ANGLE-CLOSURE GLAUCOMA IN ELDERLY SUBJECTS

Chukhraev A.M.<sup>a</sup>, Agarkov N.M.<sup>b,c</sup>, Konyaev D.A.<sup>d</sup>, Popova E.V.<sup>d</sup>, Yablokov M.M.<sup>d</sup>, Kulabukhov A.S.<sup>e</sup>

<sup>a</sup> S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> South-West State University, Kursk, Russian Federation

<sup>c</sup> Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation

<sup>d</sup> Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Tambov, Russian Federation

<sup>e</sup> Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation

**Abstract.** An increased percentage of the elderly subjects in pattern of contemporary society, along with other causes and risk factors, is accompanied by rise in the incidence of glaucoma. By 2020, according to international studies it is expected that prevalence of glaucoma patients in the world would increase up to 80 million subjects. Among the elderly, glaucoma is a common pathology, which development is associated with local disturbances in interleukin profile. However, the features of the latter in patients with primary closed-angle glaucoma in the elderly were poorly examined. Studies of local interleukin status were conducted mainly in patients with suspected or initial manifestations of primary open-angle glaucoma. The features of lacrimal fluid interleukin shift in a target group of elderly patients suffering from stage II primary closed-angle glaucoma virtually gained no attention. In addition, a limited range of local interleukins in patients with such pathology in previous studies was examined. In addition, informativity of lacrimal fluid interleukins in elderly glaucoma patients was not assessed too based on objective methods. The aim of the current study was to outline features and informativity of local interleukin profile indicators in 58 elderly patients with primary closed-angle glaucoma stage II, aged 60–74 years (main group) and 27 age-matched elderly subjects lacking such pathology. The level of interleukins in the lacrimal fluid was determined with the enzyme immunoassay “Multiscan” analyzer (Finland) by using sandwich ELISA (R&D Diagnostic Inc., USA). Informativity of measuring various interleukins was calculated according to the generally accepted formula. It was found that local interleukin profile in elderly patients with primary closed-angle glaucoma was mainly featured with increased amount of IL-2, IL-17, IL-8, but decreased IL-10. Hence, such local interleukins displayed peak informativity. The data obtained should be used in the diagnostics and treatment of such pathology, as well as of applied importance to unveil novel mechanisms behind development, diagnostics and corroboration for selective immunotropic therapy of primary closed-angle glaucoma.

**Key words:** interleukins, immunopathology, angle-closure glaucoma, elderly patients, lacrimal fluid.

## Введение

Увеличение доли пожилых в структуре современного общества, наряду с другими причинами и факторами риска, сопровождается ростом заболеваемости глаукомой. Согласно международным исследованиям в мире к 2020 г. прогнозируется увеличение больных глаукомой до 80 млн [20]. Глаукома имеет высокую распространенность в Иордании, Израиле, Бангладеш, Гаити, США, Китае, Сингапуре и других странах. Так, в Иордании с высокой частотой встречаются глаукома и катаракта [10]. Аналогичная ситуация наблюдается и в Израиле, где глаукома поражает около 10% пожилого населения с самым высоким риском в возрастном интервале 70–74 года [17]. Среди населения Ирана ведущей глазной патологией является глаукома, часто приводящая к слепоте [14]. Удельный вес пациентов с глаукомой в Индии составляет 3,23% среди городского населения и 2,70% —

в сельской местности [19]. При этом распространенность глаукомы увеличивается среди пожилого населения [19]. Самое большое количество в мире больных с данной нозологией — 21,82 млн человек — насчитывается в Китае [21]. В сельских районах Бангладеш в структуре патологии глаза доминирует также глаукома [12]. Глаукома наиболее распространена, по данным Национального комитета по предотвращению слепоты, в Гаити [18]. Увеличение частоты глаукомы прогнозируется в Китае, Сингапуре, Австралии, Канаде и США [9, 11, 22].

За период с 1996 по 2011 г. количество заболевших глаукомой в Дании возрастало с 7200 до 8600 в год ( $p < 0,001$ ) [16]. Это увеличение обусловлено прежде всего старением населения. Распространенность глаукомы также значительно увеличилась с 0,79% в 1996 г. до 1,72% в 2017 г. ( $p < 0,001$ ). Глаукома чаще встречается у пожилых и затрагивает приблизительно 10% населения в возрастной группе старше 80 лет

и 15% — среди населения 90 лет и старше. Кроме того, распространенность глаукомы выше в столице (6,28%) по сравнению с остальной частью Дании (3,96%).

В Российской Федерации за последние годы заболеваемость глаукомой среди всего населения повысилась с 89,1 случая в 2012 г. до 94,3 случаев в 2016 г. на 100 000 человек, а среди взрослого населения с 106,7 случаев в 2010 г. до 116,6 случаев на 100 000 взрослых в 2016 г. [2].

Глаукома является не только распространенным, но и тяжелым заболеванием, бесспорными факторами риска развития которого считаются повышение внутриглазного давления и пожилой возраст пациента [1, 4, 5, 13]. В последние годы при изучении патогенеза глаукомы, в том числе первичной закрытоугольной формы, значительное внимание уделяется иммунологическим факторам. Особый интерес представляет изучение интерлейкинов как у больных с первичной закрытоугольной глаукомой, так и у пожилых людей без признаков этой офтальмопатологии, поскольку возрастные изменения иммунного статуса могут способствовать возникновению заболеваний, являющихся своеобразными «спутниками» стареющего организма [5]. Считается, что заболевания в старческом возрасте возникают на фоне иммуно-нейроэндокринной дисрегуляции. Данное обстоятельство не позволяет исключить вклад инволюционных изменений в интерлейкиновый статус на местном уровне при возраст-ассоциированной первичной закрытоугольной глаукоме.

Исследования локального интерлейкинового статуса проведены в основном у пациентов с подозрением на первичную открытоугольную глаукому или ее начальными проявлениями. Особенности сдвигов интерлейкинов в слезной жидкости в группе пожилых больных, страдающих первичной закрытоугольной глаукомой II стадии, практически не анализировались. Кроме того, спектр местных интерлейкинов у пациентов с обсуждаемой патологией в ранее выполненных исследованиях являлся ограниченным. Не проводилось также определение информативности интерлейкинов слезной жидкости у пожилых пациентов с глаукомой с учетом объективных методов.

Цель настоящей работы — выявление особенностей и информативности показателей локального интерлейкинового профиля у пожилых больных с первичной закрытоугольной глаукомой.

## Материалы и методы

В исследование включено 58 больных с первичной закрытоугольной глаукомой II стадии, составивших основную группу, в возрасте 60–

74 года с медианой 70,1±2,5 лет. Всем пациентам выполнялось комплексное офтальмологическое обследование. Диагноз первичной закрытоугольной глаукомы устанавливался согласно требованиям Национального руководства по глаукоме. Контролем служили 27 пожилых людей в возрасте от 60 до 74 лет с медианой 68,7±2,1 лет без признаков и проявлений первичной закрытоугольной глаукомы, прошедших также комплексное офтальмологическое обследование.

Содержание интерлейкинов в слезной жидкости определяли иммуноферментным анализатором «Multiscan» (Финляндия) посредством сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа с применением тест-систем «R&D Diagnostic Inc.» (США). Информативность интерлейкинов рассчитывали по формуле:

$$J = 10 \lg \frac{P_1}{P_2} \times 0,5 \times (P_1 - P_2),$$

где  $J$  — информативность интерлейкина,  $P_1$  — частота интерлейкина в контрольной группе,  $P_2$  — частота того же интерлейкина в группе больных первичной закрытоугольной глаукомой.

Исследование осуществлялось в соответствии с принципами Хельсинкской декларации и стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice). Перед выполнением исследования у всех пациентов получено письменное информированное согласие на участие.

При обработке результатов исследования использовался пакет «Statistica 6.0», непараметрический критерий Т Уайта и параметрический критерий t Стьюдента. Различие считалось достоверным при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

У больных первичной закрытоугольной глаукомой II стадии происходят достоверные и существенные нарушения в локальном интерлейкиновом спектре, которые характеризуются прежде всего статистически репрезентативным повышением содержания IL-17 в 10,3 раза и IL-2 — в 9,7 раза по сравнению с контрольной группой (табл. 1). В слезной жидкости пациентов основной группы выявлено также значительное увеличение уровня IL-8 и IL-1β соответственно в 5,5 и 3,5 раза. Содержание других изученных провоспалительных интерлейкинов у пациентов с сформировавшейся первичной закрытоугольной глаукомой также возросло в сравнении с контрольной группой, но в меньшей степени. Сказанное относится к IL-6, IL-7, IL-18.

Таким образом, изменения провоспалительных интерлейкинов на местном уровне при развитии первичной закрытоугольной глаукомы сопровождаются достоверным во всех случаях увеличением их содержания. Напротив, изменения противовоспалительных интерлейкинов в слезной жидкости у пациентов с рассматриваемой офтальмологической патологией характеризуются существенным угнетением их продукции. Наиболее выраженное снижение в содержании этих интерлейкинов на локальном уровне свойственно IL-10 и в меньшей степени относится к IL-4.

Для объективизации выделения ведущих локальных интерлейкинов, ассоциируемых с первичной закрытоугольной глаукомой, рассчитаны величины информативности, представленные в таблице 2. Полученные результаты свидетельствуют, что особенностью интерлейкинового статуса слезной жидкости пожилых больных с первичной закрытоугольной глаукомой является повышенный уровень IL-2, IL-17

**Таблица 1. Содержание интерлейкинов в слезной жидкости больных первичной закрытоугольной глаукомой II стадии и в контрольной группе (M±m)**

Table 1. The content of interleukins in the lacrimal fluid of patients with stage II primary angle closure glaucoma and in the control group (M±m)

Название интерлейкина Name of interleukin	Пациенты с первичной закрытоугольной глаукомой Patients with primary angle-closure glaucoma n = 58	Контрольная группа Control group n = 27	P
IL-1β, пг/мл IL-1β, pg/ml	212,8±3,9	60,5±2,8	< 0,001
IL-2, пг/мл IL-2, pg/ml	24,3±1,1	2,5±0,5	< 0,001
IL-6, пг/мл IL-6, pg/ml	72,4±2,6	23,8±0,7	< 0,001
IL-7, пг/мл IL-7, pg/ml	9,8±1,2	3,4±0,9	< 0,001
IL-8, пг/мл IL-8, pg/ml	30,9±1,4	5,6±1,1	< 0,001
IL-17, пг/мл IL-17, pg/ml	39,2±2,7	3,8±0,5	< 0,001
IL-18, пг/мл IL-18, pg/ml	1064,5±5,8	482,7±4,9	< 0,001
IL-4, пг/мл IL-4, pg/ml	3,2±0,4	7,4±0,6	< 0,001
IL-10, пг/мл IL-10, pg/ml	2,6±0,3	12,8±0,9	< 0,001

и IL-8, занявших по величине информативности, соответственно, первое, второе и третье ранговое место.

На четвертой позиции по величине информативности среди исследованных локальных интерлейкинов, отличающих больных с первичной закрытоугольной глаукомой пожилого возраста от лиц аналогичного возраста без данной патологии, находятся противовоспалительные IL-4. Величина информативности других местных интерлейкинов в 2 и менее раза ниже, чем IL-2, IL-17, IL-18, IL-4. Это говорит о меньшей значимости их в качестве дифференциальных маркеров сформировавшейся закрытоугольной глаукомы у лиц пожилого возраста. Наименьшей информативностью в рассматриваемой ситуации обладают провоспалительные IL-18.

Показано, что пожилой возраст ассоциируется как с отсутствием, так и наличием более или менее выраженных сдвигов в системе интерлейкинов на местном уровне у больных глаукомой [5]. Анализ локального уровня провоспалительных интерлейкинов при первичной закрытоугольной глаукоме II стадии больных в возрасте 59,7 лет выявил достоверное повышение уровня IL-1β по сравнению с контролем, представленным здоровыми добровольцами в возрасте 53 лет [3]. В данном исследовании [3], как и в нашем, установлено повышение в слезной жидкости IL-2 и IL-17. Однако нами впервые на основе расчета объективных показателей информативности выявлена высокая информативность и ключевая роль IL-2 и IL-17 в развитии первичной закрытоугольной глаукомы у больных пожилого возраста. Кроме того, в нашем исследовании обнаружено более существенное повышение IL-17 и IL-2 в слезной жидкости, чем в работе Маркеловой Е.В. [3], обследовавшей пациентов среднего возраста (59,7 лет) с первичной закрытоугольной глаукомой. Данное обстоятельство позволяет утверждать, что у пациентов пожилого возраста с первичной закрытоугольной глаукомой развитие патологического процесса протекает преимущественно на фоне местной гиперпродукции IL-17 и IL-2, тогда как у лиц среднего возраста с аналогичным заболеванием и стадией, наблюдавшихся Маркеловой Е.В., формирование патологии сопровождалось гиперпродукцией в слезной жидкости только IL-2.

Высокой информативностью, как показано нами впервые, у больных пожилого возраста с первичной закрытоугольной глаукомой обладает IL-8 местного уровня, занявший третье место среди изученных интерлейкинов. Другими авторами [8] также обнаружено повышение IL-8 и CXCL-9 в слезной жидкости больных при первичной закрытоугольной глаукоме, но не выявлено зависимости между длительностью заболевания и локальным интерлейкиновым профи-

лем. Увеличение концентрации данных и других провоспалительных интерлейкинов позволяет исследователям рассматривать их в качестве медиаторов нейродегенерации при глаукоме [7]. Позже было установлено, что IL-1 $\beta$  влияет на метаболизм и выживаемость линий ганглионарных клеток сетчатки *in vitro* [6], способствуя развитию оптической нейропатии.

Напротив, противовоспалительные интерлейкины оказывают положительный эффект на поврежденные нервные волокна. Так, IL-4 и IL-10 обеспечивают выживание ганглиозных клеток сетчатки после аксонотомии в течении 14 дней [15].

В нашем исследовании впервые у больных пожилого возраста с первичной закрытоугольной глаукомой выявлено репрезентативное снижение противовоспалительных IL-4 и IL-10 в слезной жидкости. Это позволяет с новых позиций рассматривать этиопатогенез данной формы глаукомы и утверждать, что снижение продукции названных интерлейкинов способствует формированию первичной закрытоугольной глаукомы. Впервые также установлена высокая информативность местных IL-4, соответствующая четвертому ранговому месту среди изученных 9 интерлейкинов. Данный результат имеет практическое значение для диагностики и обоснования селективной иммуотропной терапии при первичной закрытоугольной глаукоме.

Ведущими диагностическими маркерами первичной закрытоугольной глаукомы в пожилом возрасте следует считать уровни IL-2, IL-17, IL-8 и IL-10. Кроме того, полученные в настоящей работе особенности местного интерлейкинового профиля лиц пожилого возраста без офтальмологической патологии могут использоваться в геронтологической практике в качестве референсных значений и являться научной основой для дальнейших исследований по поиску новых иммунологических маркеров первичной закрытоугольной глаукомы.

## Заключение

Особенностями местного интерлейкинового профиля больных первичной закрытоугольной глаукомой пожилого возраста явля-

**Таблица 2. Показатели информативности местных интерлейкинов среди пациентов с первичной закрытоугольной глаукомой II стадии**

Table 2. Indicators of informativeness of local interleukins in patients with stage II primary angle-closure glaucoma

Название интерлейкина Name of interleukin	Величина информативности The value of informativeness	Ранговое место Rank place
IL-1 $\beta$ , пг/мл IL-1 $\beta$ , pg/ml	236,1	5
IL-2, пг/мл IL-2, pg/ml	587,8	1
IL-6, пг/мл IL-6, pg/ml	161,9	7
IL-7, пг/мл IL-7, pg/ml	185,6	6
IL-8, пг/мл IL-8, pg/ml	425,7	3
IL-17, пг/мл IL-17, pg/ml	536,4	2
IL-18, пг/мл IL-18, pg/ml	93,2	9
IL-4, пг/мл IL-4, pg/ml	128,3	8
IL-10, пг/мл IL-10, pg/ml	402,3	4

ются повышенный уровень в слезной жидкости противовоспалительных IL-2, IL-17, IL-8 и снижение продукции противовоспалительных IL-10. Указанные локальные интерлейкины обладают наибольшей информативностью, что имеет научно-практическое значение для выделения новых механизмов развития, диагностики и обоснования селективной иммуотропной терапии рассматриваемой патологии.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы/References

1. Авдеев Р.В., Александров А.С., Бакунина Н.А., Басинский А.С., Блюм Е.А., Брежнев А.Ю., Волков Е.Н., Газизова И.Р., Галимова А.Б., Гапонько О.В., Гарькавенко В.В., Гетманова А.М., Городничий В.В., Горшкова М.С., Гусаревич А.А., Диордийчук С.В., Дорофеев Д.А., Жаворонков С.А., Завадский П.Ч., Зверева О.Г., Каримов У.Р., Кулик А.В., Куроедов А.В., Ланин С.Н., Ловпаче Дж.Н., Лоскутов И.А., Молчанова В.В., Огородникова В.Ю., Онуфрийчук О.Н., Петров С.Ю., Рожко Ю.И., Сиденко Т.А. Прогнозирование продолжительности сроков заболевания и возраста пациентов с разными стадиями первичной открытоугольной глаукомы // Национальный журнал глаукома. 2014. Т. 13, № 2. С. 60–69. [Avdeev R.V., Alexandrov A.S., Bakunina N.A., Basinsky A.S., Blyum E.A., Brezhnev A.Yu., Volkov E.N., Galimova A.B., Gaponko O.V., Garkavenko V.V., Getmanova A.M., Gorodnichiy V.V., Gorshkova M.S., Gusarevich A.A., Diordiychuk S.V., Dorofeev D.A., Zavoronkov S.A., Zavadskiy P.Ch., Zvereva O.G., Karimov U.R., Kulik A.V., Kuroedov A.V., Lanin S.N., Lovpache Dzh.N., Loskutov I.A., Molchanova V.V., Ogorodnikova V.Yu., Onufriychuk O.N., Petrov S.Yu., Rozhko Yu.I., Sidenko T.A. Prognostication of the duration of the disease and the age of patients with different stages of primary open-angle glaucoma // National journal of glaucoma. 2014. T. 13, No 2. P. 60–69.]

- Gazizova I.R., Galimova A.B., Gaponko O.V., Garkavenko V.V., Getmanova A.M., Gorodnichy V.V., Gorshkova M.S., Gusarevitch A.A., Diordiychuk S.V., Dorofeev D.A., Zhavoronkov S.A., Zavadsky P.Ch., Zvereva O.G., Karimov U.R., Kulik A.V., Kuroyedov A.V., Lanin S.N., Lovpache D.N., Loskutov I.A., Molchanova V.V., Ogorodnikova V.Yu., Onufrihchuk O.N., Petrov S.Yu., Rozhko Yu.I., Sidenko T.A. Prediction of disease duration and age of patients with different primary open-angle glaucoma changes. *Natsional'nyi zhurnal glaukoma = National Journal Glaucoma*, 2014, vol. 13, no. 2, pp. 60–69. (In Russ.)]
2. Азнабаев М.Т. Состояние офтальмологической помощи в Республике Башкортостан и пути ликвидации устранимой слепоты // Ликвидация устранимой слепоты: Всемирная инициатива ВОЗ: матер. Рос. межрегион. симп. М., 2003. С. 60–68. [Aznabaev M.T. Status of ophthalmic care in the Republic of Bashkortostan and ways to eliminate the avoidable blindness. Elimination of avoidable blindness: WHO world initiative: Proceedings of the Russian Interregional Symposium. Moscow, 2003, pp. 60–68. (In Russ.)]
  3. Маркелова Е.В., Хохлова А.С., Кириенко А.В., Филина Н.В., Серебрянная Н.Б. Особенности иммунопатогенеза и дополнительные дифференциальные маркеры первичной открытоугольной и первичной закрытоугольной глауком // Здоровье и образование в XXI веке. 2016. Т. 18, № 2. С. 613–621. [Markelova E.V., Khokhlova A.S., Kirienko A.V., Filina N.V., Serebryannaya N.B. Features of immunopathogenesis and additional differential markers of primary open-angle and primary angle-closure glaucoma. *Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke = Health and Education in the XXI Century*, 2016, vol. 18, no. 2, pp. 613–621 (In Russ.)].
  4. Петров С.Ю., Антонов А.А., Макарова А.С., Вострухин С.В. Офтальмотонус в оценке медикаментозного и хирургического лечения глаукомы // Русский медицинский журнал. Клиническая офтальмология. 2015. Т. 16, № 2. С. 69–72. [Petrov S.Yu., Antonov A.A., Makarova A.S., Vostrukhin S.V. Ophthalmotonus in evaluation of medical and surgical treatment of glaucoma. *Russkii meditsinskii zhurnal. Klinicheskaya oftal'mologiya = Russian Medical Journal. Clinical Ophthalmology*, 2015, vol. 16, no. 2, pp. 69–72. (In Russ.)]
  5. Слепова О.С., Арапиев М.У., Ловпаче Д.Н., Балацкая Н.В., Куликова И.Г. Особенности местного и системного цитокинового статуса у здоровых разного возраста и пациентов с начальной стадией первичной открытоугольной глаукомы // Национальный журнал глаукома. 2016. Т. 15, № 1. С. 3–12. [Slepova O.S., Arapiev M.U., Lovpache D.N., Balatskaya N.V., Kulikova I.G. Features of local and systemic cytokine status in healthy patients of different ages and patients with initial stage of primary open-angle glaucoma. *Natsional'nyi zhurnal glaukoma = National Journal Glaucoma*, 2016, vol. 15, no. 1, pp. 3–12. (In Russ.)]
  6. Abcouwer S.F., Shanmugam S., Gomez P.F., Shushanov S., Barber A., Lanoue K., Quinn P., Kester M., Gardner T. Effect of IL-1beta on survival and energy metabolism of R28 and RGC-5 retinal neurons. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2008, vol. 49, no. 12, pp. 5581–5592. doi: 10.1167/iovs.07-1032
  7. Alexandrescu C., Dascalu A.M., Mitulescu C., Panca A., Ciuluvica R., Potop V., Voinea L. Evidence-based pathophysiology of glaucoma. *Maedica*, 2010, vol. 5, no. 3, pp. 207–213.
  8. Chua J., Vania M., Cheung C.M., Ang M., Chee S., Yang H., Li J., Wong T. Expression profile of inflammatory cytokines in aqueous from glaucomatous eyes. *Molecular Vision*, 2012, no. 18, pp. 431–438.
  9. Gibson D.M. Frequency and predictors of missed visits to primary care and eye care providers for annually recommended diabetes preventive care services over a two-year period among U.S. adults with diabetes. *Prev. Med.*, 2017, vol. 105, pp. 257–264. doi: 10.1016/j.ypmed.2017.09.019
  10. Haddad M.F., Bakkar M.M., Abdo N. Public awareness of common eye diseases in Jordan. *BMC Ophthalmol.*, 2017, no. 17: 177. doi: 10.1186/s12886-017-0575-3
  11. Harrabi H., Kergoat M.J., Rousseau J., Boisjoly H., Schmaltz H., Moghadaszadeh S., Roy-Gagnon M.H., Freeman E.E. Age-related eye disease and cognitive function. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2015, vol. 56, no. 2, pp. 1217–1221. doi: 10.1167/iovs.14-15370
  12. Islam F.M., Chakrabarti R., Islam S.Z., Finger R.P., Critchley C. Factors associated with awareness, attitudes and practices regarding common eye diseases in the general population in a rural district in Bangladesh: the Bangladesh population-based diabetes and eye study (BPDES). *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 7: e0133043. doi: 10.1371/journal.pone.0133043
  13. Kass M.A., Gordon M.O., Gao F., Heuer D.K., Higginbotham E.J., Johnson C.A., Keltner J.K., Miller J.P., Parrish R.K., Wilson M.R. for the Ocular Hypertension Treatment Study Group. Delaying treatment of ocular hypertension: the ocular hypertension treatment study. *Arch. Ophthalmol.*, 2010, vol. 128, no. 3, pp. 276–287. doi: 10.1001/archophthalmol.2010.20
  14. Katibeh M., Ziaei H., Panah E., Moein H.R. Knowledge and awareness of age related eye diseases: a population-based survey. *J. Ophthalmic. Vis. Res.*, 2014, vol. 9, no. 2, pp. 223–231.
  15. Koeberle P.D., Gaultie J., Ball A.K. Effects of adenoviral-mediated gene transfer of interleukin-10, interleukin-4, and transforming growth factor-beta on the survival of axotomized retinal ganglion cells. *Neuroscience*, 2004, vol. 125, no. 4, pp. 903–920. doi: 10.1016/S0306-4522(03)00398-1
  16. Kolko M., Horwitz A., Thygesen J., Jeppesen J., Torp-Pedersen C. The Prevalence and incidence of glaucoma in Denmark in a fifteen year period: a nationwide study. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 7: e0132048.
  17. Levkovitch-Verbin H., Goldshtein I., Chodick G., Zigman N., Shalev V. The Maccabi Glaucoma Study: prevalence and incidence of glaucoma in a large Israeli health maintenance organization. *Am. J. Ophthalmol.*, 2014, vol. 158, no. 2, pp. 402–408. doi: 10.1016/j.ajo.2014.04.026
  18. Napoli P.E., Sanna R., Iovino C., Fossarello M. Resolution of pinguecula-related dry eye disease after argon laser photocoagulation. *Int. Med. Case Rep. J.*, 2017, no. 10, pp. 247–250. doi: 10.2147/IMCRJ.S138786
  19. Paul C., Sengupta S., Choudhury S. Prevalence of glaucoma in Eastern India: the Hooghly river glaucoma study. *Indian J. Ophthalmol.*, 2016, vol. 64, no. 8, pp. 578–83. doi: 10.4103/0301-4738.191497
  20. Tham Y.C., Li X., Wong T.Y., Quigley H.A., Aung T., Cheng C.Y. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology*, 2014, no. 121, pp. 2081–2090. doi: 10.1016/j.ophtha.2014.05.013

21. Zhao Y., Fu J.L., Li Y.L. Epidemiology and clinical characteristics of patients with glaucoma: an analysis of hospital data between 2003 and 2012. *Indian J. Ophthalmol.*, 2015, vol. 63, no. 11, pp. 825–831.
22. Zheng Y., Cheng C.Y., Lamoureux E.L., Chiang P.P., Rahman Anuar A., Wang J.J., Mitchell P., Saw S.M., Wong T.Y. How much eye care services do Asian populations need? Projection from the Singapore Epidemiology of Eye Disease (SEED) study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2013, vol. 54, no. 3, pp. 2171–2177. doi: 10.1167/iov.12-11393

---

**Авторы:**

**Чухраев А.М.**, д.м.н., профессор, генеральный директор ФГАУ МНТК «Микрохирургия глаза им. акад. С.Н. Федорова», Москва, Россия;

**Агарков Н.М.**, д.м.н., профессор кафедры биомедицинской инженерии ФГБОУ ВО Юго-Западный государственный университет, г. Курск, Россия;

**Коняев Д.А.**, врач-офтальмолог ФГАУ Тамбовский филиал МНТК «Микрохирургия глаза им. акад. С.Н. Федорова», г. Тамбов, Россия;

**Попова Е.В.**, врач-офтальмолог ФГАУ Тамбовский филиал МНТК «Микрохирургия глаза им. акад. С.Н. Федорова», г. Тамбов, Россия;

**Яблоков М.М.**, врач-офтальмолог ФГАУ Тамбовский филиал МНТК «Микрохирургия глаза им. акад. С.Н. Федорова», г. Тамбов, Россия;

**Кулабухов А.С.**, к.м.н., зав. кафедрой сестринского дела ФГБОУ ВО Курский государственный медицинский университет, г. Курск, Россия.

**Authors:**

**Chukhraev A.M.**, PhD, MD (Medicine), Professor, General Director, S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Moscow, Russian Federation;

**Agarkov N.M.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Professor of the Department of Biomedical Engineering, South-West State University, Kursk, Russian Federation;

**Konyaev D.A.**, Ophthalmologist, Tambov Branch of the S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Tambov, Russian Federation;

**Popova E.V.**, Ophthalmologist, Tambov Branch of the S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Tambov, Russian Federation;

**Yablokov M.M.**, Ophthalmologist, Tambov Branch of the S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Tambov, Russian Federation;

**Kulabukhov A.S.**, PhD (Medicine), Head of the Department of Nursing, Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation.

---

Поступила в редакцию 11.07.2019  
Отправлена на доработку 26.11.2019  
Принята к печати 11.03.2020

---

Received 11.07.2019  
Revision received 26.11.2019  
Accepted 11.03.2020

# ОЦЕНКА ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА У ПАЦИЕНТОК С ХРОНИЧЕСКИМ ЭНДОМЕТРИТОМ В СОЧЕТАНИИ С ГИПЕРПЛАСТИЧЕСКИМИ ПРОЦЕССАМИ ЭНДОМЕТРИЯ В РЕПРОДУКТИВНОМ ПЕРИОДЕ

Л.В. Ткаченко, Н.И. Свиридова, Н.А. Жаркин, Н.А. Булова, Э.Б. Белан

ФГБОУ ВО Волгоградский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Волгоград, Россия

**Резюме.** Целью настоящего исследования было изучение локального и сывороточного уровней цитокинов, участвующих в регуляции воспаления, у пациенток с хроническим эндометритом в сочетании с гиперпластическими процессами эндометрия. Всем пациенткам при поступлении в стационар была выполнена гистероскопия с раздельным диагностическим выскабливанием и последующим гистологическим исследованием соскобов слизистой полости матки и цервикального канала. Показаниями к их выполнению являлись аномальные маточные кровотечения, а также подозрение на патологию эндометрия по данным ультразвукового сканирования. На основании данных гистологического исследования ткани эндометрия все пациентки были разделены на 2 группы: I группу составили 45 женщин с хроническим эндометритом (ХЭ) в сочетании с простой гиперплазией эндометрия (ПГЭ) без атипии; II группу — 38 пациенток с морфологически верифицированным ХЭ в сочетании с комплексной гиперплазией эндометрия (КГЭ) без атипии. Определение концентрации IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  в биологических жидкостях (аспирате из полости матки, сыворотке крови) осуществлялось методом твердофазного иммуноферментного анализа. В ходе настоящего исследования установлено, что в подавляющем большинстве случаев причиной госпитализации пациенток обеих групп (91,1 и 89,6% соответственно) явились аномальные маточные кровотечения. В структуре нарушений менструального цикла обследуемых больных доминировала олигоменорея, чередующаяся с межменструальными кровотечениями (66,7 и 71,2% соответственно), в то время как у 11 (24,4%) пациенток I группы и у 7 (18,4%) больных II группы отмечались обильные менструальные кровотечения. В целом анализ полученных нами данных о концентрации цитокинов, как в аспирате из полости матки, так и в сыворотке крови, свидетельствует о продолжающемся воспалительном процессе на момент обследования. При этом процесс носит не только локальный характер, но и имеет признаки системной воспалительной реакции. Данные об уровне цитокинов в аспирате из полости матки пациенток с ХЭ в сочетании с ПГЭ или КГЭ без атипии свидетельствуют о наличии локального воспалительного процесса, который характеризуется статистически значимым повышением концентрации IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$ . При этом более высокий уровень IL-1 $\beta$  и IFN $\gamma$  у пациенток II группы, вероятно, свидетельствует о влиянии степени морфологических изменений в эндометрии на уровень локальной продукции цитокинов. Таким образом, полученные данные показывают, что иммунные изменения при хроническом эндометрите в сочетании с неатипическими гиперпластическими

**Адрес для переписки:**

Свиридова Наталия Ивановна  
400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1,  
Волгоградский государственный медицинский университет.  
Тел.: 8 906 409-03-43.  
E-mail: n.i.sviridova@yandex.ru

**Contacts:**

Natalia I. Sviridova  
400131, Russian Federation, Volgograd, Pavshikh bortsov sq., 1,  
Volgograd State Medical University.  
Phone: +7 906 409-03-43.  
E-mail: n.i.sviridova@yandex.ru

**Библиографическое описание:**

Ткаченко Л.В., Свиридова Н.И., Жаркин Н.А., Булова Н.А., Белан Э.Б.  
Оценка цитокинового статуса у пациенток с хроническим  
эндометритом в сочетании с гиперпластическими процессами  
эндометрия в репродуктивном периоде // Инфекция и иммунитет. 2020.  
Т. 10, № 4. С. 762–768. doi: 10.15789/2220-7619-AOC-1357

**Citation:**

Tkachenko L.V., Sviridova N.I., Zharkin N.A., Burova N.A., Belan E.B.  
Assessing cytokine status of patients with chronic endometritis combined  
with endometrial hyperplastic processes in reproductive period // Russian  
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10,  
no. 4, pp. 762–768. doi: 10.15789/2220-7619-AOC-1357

процессами эндометрия происходят преимущественно на локальном уровне. В связи с этим определение концентрации цитокинов в аспирате из полости матки является прогностически значимым для диагностики и контроля эффективности проводимой терапии у данной когорты пациенток.

**Ключевые слова:** цитокиновый статус, хронический эндометрит, гиперпластические процессы эндометрия, репродуктивный период.

## ASSESSING CYTOKINE STATUS OF PATIENTS WITH CHRONIC ENDOMETRITIS COMBINED WITH ENDOMETRIAL HYPERPLASTIC PROCESSES IN REPRODUCTIVE PERIOD

Tkachenko L.V., Sviridova N.I., Zharkin N.A., Burova N.A., Belan E.B.

*Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation*

**Abstract.** The goal of our study was to examine local and serum cytokine level involved in regulating inflammation in patients with chronic endometritis combined with endometrial hyperplastic processes. On admission, all patients underwent hysteroscopy with separate diagnostic curettage followed by histological examination of samples isolated from the uterine and cervical canal mucosa. Such manipulations were indicated due to abnormal uterine bleeding as well as suspected endometrial pathology based on ultrasound examination. According to the histological examination data of the endometrial samples, all patients were divided into two groups: group I contained 45 women with CE combined with PEG without atypia; group II — 38 patients with morphologically verified CEE combined with AEG without atypia. Level of IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  in biological fluids (aspirate from the uterus; serum) was measured by using enzyme-linked immunosorbent assay. We found that in both groups (91.1% and 89.6%, respectively) the vast majority of patients was hospitalized due to abnormal uterine bleeding. Oligomenorrhea alternated with intermenstrual bleeding (66.7% and 71.2%, respectively) and dominated in pattern of menstrual cycle disorders in the examined patients, whereas 11 (24.4%) and 7 (18.4%) patients from group I and II, respectively, were noted to suffer from severe menstrual bleeding. Overall, analyzing the data on cytokine level both in the uterine aspirate and serum evidences about ongoing inflammatory process found at examination time point. Upon that, such process was not only local, but also exhibited signs of a systemic inflammatory response. The data on cytokine level in the uterine aspirate from patients with CE coupled to PGE or CGE without atypia point at local inflammatory process characterized by significantly increased concentration of IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$ . At the same time, higher level of IL-1 $\beta$  and IFN $\gamma$  in patients from group II might indicate that degree of morphological changes in the endometrium could affect the level of local cytokine production. Thus, the data obtained evidence that immune changes in chronic endometritis combined with non-atypical endometrial hyperplastic processes mostly occur locally. In this regard, measuring cytokine concentration in the uterine aspirate is a diagnostic predictor and serves as a sign for monitoring therapeutic effectiveness of therapy in this cohort of patients.

**Key words:** cytokine status, chronic endometritis, endometrial hyperplastic processes, reproductive period.

## Введение

В последние годы в иммунологии репродуктивной системы все большее внимание уделяется изучению локальных иммунных ответов. Предметом многих работ в этой области стала оценка количественного и качественного состава иммунокомпетентных клеток аутопического и эктопического эндометрия, как в норме, так и при различных патологических состояниях [1, 3, 6, 7, 16].

Известно, что матка является гистологически гетерогенным и сложно организованным органом, в котором локальные иммунные механизмы действуют совместно с системными, защищая от инвазии. Для защиты от внешних агентов и обеспечения резистентности к опухолевому росту эндометрий обладает собственными иммунными механизмами защиты [3, 6, 7]. В частности, в литературе имеются данные, свидетельствующие о том, что эндометрий здоровой женщины содержит значительное коли-

чество иммунокомпетентных клеток. При этом примерно 25% клеточных популяций эндометрия составляют лейкоциты [3].

Следует отметить, что данные о состоянии локального иммунитета эндометрия в течение нормального менструального цикла противоречивы. Тем не менее наличие клеток иммунной системы в эндометрии обусловлено необходимостью создания барьера на пути инфекционных патогенов, инициирующим фактором которого являются в том числе провоспалительные цитокины. С другой стороны, продолжающийся в эндометрии синтез провоспалительных цитокинов может оказывать в дальнейшем влияние на интенсивность клеточного роста и пролиферации [3, 6, 7].

Большинство научных исследований последних лет посвящены изучению локального иммунитета эндометрия при эндометриозе, миоме матки, хроническом эндометрите (ХЭ) и привычном невынашивании беременности. При этом данные о состоянии локального им-

мунитета при гиперпластических процессах эндометрия у больных с аномальными маточными кровотечениями крайне противоречивы [7, 12, 16].

Как известно, в репродуктивном периоде ХЭ является одним из важных патогенетических звеньев развития гиперпластических процессов эндометрия (ГПЭ) и, как следствие, аномальных маточных кровотечений (АМК) [11, 13, 14, 15]. Хронический эндометрит представляет собой клинико-морфологический синдром, характеризующийся комплексом морфофункциональных изменений эндометрия воспалительного генеза, приводящих к нарушению циклической биотрансформации и рецептивности слизистой оболочки матки [1, 5, 6, 7, 10, 12]. Как при любом воспалительном процессе, при ХЭ происходит целый каскад локальных сосудисто-тканевых реакций, в том числе активация синтеза цитокинов «опасного» профиля (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 и TNF $\alpha$ ). Учитывая кратковременность существования цитокинов, сохранение повышенной продукции их провоспалительного комплекса связывают с продолжением воспалительной реакции на фоне персистенции инфекционных агентов [9]. Длительная антигенная стимуляция иммунокомпетентной системы, обусловленная персистенцией микробных агентов в эндометрии, приводит к ее функциональной перегрузке, истощению и развитию аутоиммунных реакций, вызывающих дополнительное повреждение ткани [4, 8, 10].

Течение хронического эндометрита сопряжено с развитием вторичных морфофункциональных изменений эндометрия, заключающихся в активации склеротических процессов с повреждением экстрацеллюлярного матрикса, нарушением медиаторных межклеточных взаимодействий, изменением ангиоархитектоники ткани и ее ишемии [1, 6, 12, 13], что в последующем влечет за собой развитие ГПЭ, одним из клинических проявлений которых являются АМК.

Целью настоящего исследования было изучение локального и сывороточного уровней провоспалительных цитокинов у пациенток с ХЭ в сочетании с ГПЭ.

## Материалы и методы

Работа представляла собой открытое проспективное сравнительное исследование в параллельных группах. Критериями включения пациенток в исследование явились: 1) возраст пациенток от 18 до 35 лет; 2) наличие морфологически подтвержденного ХЭ в сочетании с неатипическими формами гиперплазии эндометрия (простая гиперплазия эндометрия (ПГЭ) без атипии, комплексная гиперплазия

эндометрия (КГЭ) без атипии); 3) информированное добровольное согласие пациенток на проведение необходимых лечебно-диагностических мероприятий. Критериями исключения стали: 1) полипы эндометрия; 2) атипическая гиперплазия и рак эндометрия; 3) миома матки больших размеров; субмукозная локализация миоматозных узлов; 4) наружный генитальный и экстрагенитальный эндометриоз, аденомиоз I–III степени; 5) острые воспалительные заболевания органов малого таза; 6) наличие аллергических реакций.

Всем пациенткам при поступлении в стационар была выполнена гистероскопия с отдельным диагностическим выскабливанием и последующим гистологическим исследованием соскобов слизистой полости матки и цервикального канала. Показаниями к их выполнению являлись аномальные маточные кровотечения, а также подозрение на патологию эндометрия по данным ультразвукового сканирования.

На основании данных гистологического исследования ткани эндометрия все пациентки были разделены на две группы: I группу составили 45 женщин с ХЭ в сочетании с ПГЭ без атипии; II группу — 38 пациенток с морфологически верифицированным ХЭ в сочетании с КГЭ без атипии.

Определение концентрации цитокинов осуществлялось методом твердофазного иммуноферментного анализа (фотометр «Multiskan Ascent», ThermoElectron, Финляндия) с использованием реактивов фирмы «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия). В исследовании проводили оценку как «системных» (в сыворотке крови), так и «тканевых» (в аспирате из полости матки) цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ). Полученные результаты сравнивались с локальным и системным уровнем содержания цитокинов у 30 здоровых женщин репродуктивного возраста, обратившихся для подбора контрацепции, которые составили контрольную группу.

Для углубленного изучения полученных численных результатов применялись методы вариационной статистики в модификации алгоритмов пакета прикладных программ «Statistica 6.0». Статистическую значимость различий сопоставляемых средних величин определяли по параметрическому критерию Стьюдента (t).

## Результаты и обсуждение

В ходе настоящего исследования установлено, что в подавляющем большинстве случаев причиной госпитализации пациенток обеих групп (91,1 и 89,6% соответственно) явились аномальные маточные кровотечения.

В структуре нарушений менструального цикла обследуемых больных доминировала олигоменорея, чередующаяся с межменструальными кровотечениями (66,7 и 71,2% соответственно), в то время как у 11 (24,4%) пациенток I группы и у 7 (18,4%) больных II группы отмечались обильные менструальные кровотечения.

Данные морфологического исследования свидетельствуют о наличии у всех пациенток I и II групп отека стромы эндометрия. Обращает на себя внимание тот факт, что инфильтрация стромы эндометрия лимфоцитами гистиоцитами, а также выраженная фибропластическая трансформация стромы достоверно чаще ( $p < 0,05$ ) встречались у больных с КГЭ без атипии (табл. 1).

Анализ полученных нами данных о концентрации цитокинов как в аспирате из полости матки, так и в сыворотке крови, свидетельству-

ет о продолжающемся воспалительном процессе на момент обследования. При этом он носит не только локальный характер, но и имеет признаки системной воспалительной реакции.

При исследовании аспириата из полости матки наибольшие отклонения от показателей женщин контрольной группы были отмечены для ранних провоспалительных цитокинов. Так, концентрация IL-1 $\beta$  в аспириатах из полости матки пациенток обеих групп была достоверно выше ( $p < 0,05$ ) таковой у женщин контрольной группы. Обращают на себя внимание статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) данного показателя между пациентками I и II групп, при этом более высокая концентрация IL-1 $\beta$  выявлена у пациенток, имеющих сочетание ХЭ с КГЭ без атипии (табл. 2).

Значительное усиление продукции отмечено также со стороны TNF $\alpha$  (табл. 2). Следует

**Таблица 1. Результаты морфологического исследования эндометрия у обследованных пациенток**

Table 1. The results of the morphological study of the endometrium in the examined patients

Морфологические изменения эндометрия Endometrial morphological changes	Группы пациенток Patient groups		
	I группа I group n = 45	II группа II group n = 38	Контрольная группа Control group n = 30
Отек стромы эндометрия Endometrial stromal edema	45 (100%)*	14 (23,3%)*	0 (0%)
Инфильтрация стромы эндометрия/Endometrial stromal infiltration: – лимфоцитами/lymphocytes – лимфоцитами с гистиоцитами/lymphocytes with hystiocytes	34 (75,6%)* 26 (57,9%)* 8 (17,7%)*	35 (92,1%)* 24 (63,1%)* 11 (29,0%)*, **	0 (0%) 0 (0%) 0 (0%)
Альтерация эпителиоцитов и клеток желез Alteration of epithelial cells and gland cells	10 (22,2%)*	11 (28,9%)*	0 (0%)
Некроз стромы эндометрия Endometrial stromal necrosis	2 (4,4%)*	2 (5,3%)*	0 (0%)
Явления тромбоза с признаками организации тромбов Phenomena of thrombovascular disease with signs of the organization of blood clots	4 (8,9%)*	4 (10,5%)*	0 (0%)
Умеренный фиброз волокнистых структур стромы эндометрия Moderate fibrosis of structures of the endometrial stroma	22 (48,9%)*	9 (23,7%)*, **	0 (0%)
Выраженная фибропластическая трансформация стромы эндометрия Severe fibroplastic transformation of the endometrial stroma	23 (51,1%)*	29 (76,3%)*, **	0 (0%)
Стромальные кальцификаты Stromal calcifications	8 (17,8%)*	8 (21,1%)*	0 (0%)
Эндометрий в фазе пролиферации Endometrial proliferation phase	0 (0%)*	0 (0%)*	30 (100%)
Очаговая гиперплазия эндометрия Focal hyperplasia of the endometrium	4 (8,9%)*	1 (2,6%)*, **	0 (0%)
ПГЭ без атипии SEH without atypia	45 (100%)*	0 (0%)	0 (0%)
КГЭ без атипии CEH without atypia	0 (0%)	38 (100%)*	0 (0%)

**Примечание.** \* — различие показателей по сравнению с пациентками контрольной группы достоверно ( $p < 0,05$ ); \*\* — различие показателей по сравнению с пациентками I группы достоверно ( $p < 0,05$ ).

Note. \* — the difference in performance compared with patients in the control group was significantly ( $p < 0,05$ ); \*\* — the difference in performance compared with patients of group I was significantly ( $p < 0,05$ ).

**Таблица 2. Концентрация цитокинов в аспиратах из полости матки у обследованных пациенток**

Table 2. Concentration of cytokines in aspirants from the uterus in the examined patients

Исследуемый показатель, пг/мл The studied indicator, pg/ml	Группы пациенток Patient groups		
	I группа I group n = 45	II группа II group n = 38	Контрольная группа Control group n = 30
IL-1 $\beta$ , M $\pm$ $\sigma$	261,21 $\pm$ 16,86*	270,16 $\pm$ 18,12*,**	127,80 $\pm$ 10,14
IL-2, M $\pm$ $\sigma$	226,04 $\pm$ 18,11*	232,12 $\pm$ 16,08*	140,61 $\pm$ 12,25
IL-6, M $\pm$ $\sigma$	122,41 $\pm$ 9,85*	126,42 $\pm$ 10,42*	82,68 $\pm$ 9,21
TNF $\alpha$ , M $\pm$ $\sigma$	224,78 $\pm$ 14,06*	230,08 $\pm$ 15,20*	76,56 $\pm$ 9,02
IFN $\gamma$ , M $\pm$ $\sigma$	208,48 $\pm$ 12,05*	215,76 $\pm$ 14,36*,**	120,09 $\pm$ 12,07

**Примечание.** \* — различие показателей по сравнению с пациентками контрольной группы достоверно ( $p < 0,05$ ); \*\* — различие показателей по сравнению с пациентками I группы достоверно ( $p < 0,05$ ).

Note. \* — the difference in performance compared with patients in the control group was significantly ( $p < 0,05$ ); \*\* — the difference in performance compared with patients of group I was significantly ( $p < 0,05$ ).

отметить, что его уровень у больных при сопоставимости в обеих группах превышал в 3 раза соответствующий показатель пациенток контрольной группы.

Еще одним ранним провоспалительным цитокином является IL-6. Как показало исследование, его концентрация в аспирате из полости матки у больных, имеющих сочетание ХЭ с ПГЭ или КГЭ без атипии, была достоверно выше ( $p < 0,05$ ), чем у женщин контрольной группы, однако не зависела от морфологической структуры эндометрия (табл. 2).

Та же закономерность сохранялась и для IL-2, роль которого определяется как «универсальный дирижер иммунного ответа». В аспиратах из полости матки отмечено достоверное повышение его уровня в обеих группах по отношению к его показателям у женщин контрольной группы ( $p < 0,05$ ) без достоверной разницы средних межгрупповых значений (табл. 2).

Исследование IFN $\gamma$ , стимулирующего клеточную цитотоксичность и макрофагальную активность, выявило достоверное повышение ( $p < 0,05$ ) его концентрации в обеих группах по сравнению с показателями пациенток контрольной группы, при этом наличие морфологически верифицированного сочетания ХЭ с КГЭ без атипии сопровождалась достоверно ( $p < 0,05$ ) более высоким уровнем его продукции (табл. 2).

Таким образом, полученные нами данные об уровне цитокинов в аспирате из полости матки у пациенток с ХЭ в сочетании с ПГЭ или КГЭ без атипии свидетельствуют о наличии локального воспалительного процесса, который характеризуется статистически значимым ( $p < 0,05$ ) повышением концентрации IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$ . При этом более высокий уровень IL-1 $\beta$  и IFN $\gamma$  у пациенток II группы может свидетельствовать о влиянии степени мор-

**Таблица 3. Концентрация цитокинов в сыворотке крови у обследованных пациенток**

Table 3. Serum cytokine concentration in the examined patients

Исследуемый показатель, пг/мл The studied indicator, pg/ml	Группы пациенток Patient groups		
	I группа I group n = 45	II группа II group n = 38	Контрольная группа Control group n = 30
IL-1 $\beta$ , M $\pm$ $\sigma$	7,60 $\pm$ 0,54*	7,74 $\pm$ 0,65*	6,5 $\pm$ 0,12
IL-2, M $\pm$ $\sigma$	32,08 $\pm$ 4,12*	35,12 $\pm$ 4,02*,**	9,24 $\pm$ 2,62
IL-6, M $\pm$ $\sigma$	10,38 $\pm$ 0,35*	10,48 $\pm$ 0,64*	9,02 $\pm$ 0,41
TNF $\alpha$ , M $\pm$ $\sigma$	3,51 $\pm$ 0,29*	3,62 $\pm$ 0,41*	2,81 $\pm$ 0,25
IFN $\gamma$ , M $\pm$ $\sigma$	10,45 $\pm$ 1,14*	11,62 $\pm$ 1,28*,**	8,56 $\pm$ 1,14

**Примечание.** \* — различие показателей по сравнению с пациентками контрольной группы достоверно ( $p < 0,05$ ); \*\* — различие показателей по сравнению с пациентками I группы достоверно ( $p < 0,05$ ).

Note. \* — the difference in performance compared with patients in the control group was significantly ( $p < 0,05$ ); \*\* — the difference in performance compared with patients of group I was significantly ( $p < 0,05$ ).

фологических изменений в эндометрии на уровень локальной продукции цитокинов.

Анализ полученных данных сывороточного уровня изучаемых цитокинов свидетельствует о поддержании воспаления при ХЭ и на системном уровне (табл. 3).

В ходе настоящего исследования было установлено, что концентрация IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$ , так же как и в аспирате из полости матки, была достоверно выше ( $p < 0,05$ ) у пациенток, имеющих сочетание ХЭ и ПГЭ или КГЭ без атипии в сравнении с женщинами контрольной группы (табл. 3). Следует отметить, что сывороточная концентрация уровня IL-2 и IFN $\gamma$  у пациенток II группы статистически значимо ( $p < 0,05$ ) превышала данный показатель больных, имеющих сочетание ХЭ и ПГЭ без атипии.

Обращает на себя внимание тот факт, что концентрация уровня провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$  в аспиратах из полости матки была достоверно выше в сравнении с их уровнем в периферической крови у обследованных пациенток ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что иммунные изменения при ХЭ в сочетании с неатипическими гиперпластическими процессами эндометрия происходят преимущественно на локальном уровне. В связи с этим определение концентрации цитокинов в аспирате из полости матки является прогностически значимым для диагностики и контроля эффективности проводимой терапии у данной когорты пациенток.

## 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., Pahuridze R.F., Smolova N.V., Andreeva M.V. The level of IL-8 in serum as a marker of the course 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. Гомболевская Н.А., Бурменская О.В., Демура Т.А., Марченко Л.А. Оценка экспрессии мРНК генов цитокинов в эндометрии при хроническом эндометрите // Акушерство и гинекология. 2013. № 11. С. 35–40. [Gombolevskaia N.A., Burmenskaya O.V., Demura T.A., Marchenko L.A. Evaluation of mRNA expression of cytokine genes in the endometrium in chronic endometritis. *Akusherstvo i ginekologija = Obstetrics and Gynecology*, 2013, no. 11, pp. 35–40. (In Russ.)]
3. Данусевич И.Н. Цитокино-гормональные взаимодействия при хроническом эндометрите у женщин с репродуктивными нарушениями // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2015. Т. 14, № 4. С. 42–48. [Danusevich I.N. Cytokine-hormonal interactions in chronic endometritis in women with reproductive disorders. *Voprosy ginekologii, akusherstva i perinatologii = Gynecology, Obstetrics and Perinatology*, 2015, vol. 14, no. 4, pp. 42–48. (In Russ.)]
4. Дикке Г.Б., Остроменский В.В. Нарушение иммунного статуса при хроническом эндометрите и опыт его коррекции посредством локальной цитокинотерапии // Акушерство и гинекология. 2019. № 9. С. 139–146. [Dikke G.B., Ostromenskiy V.V. Immune dysfunction in chronic endometritis and the experience of its correction using local cytokine therapy. *Akusherstvo i ginekologija = Obstetrics and Gynecology*, 2019, no. 9, pp. 139–146. (In Russ.)]
5. Зарочентсева Н.В., Аршакян А.К., Меньшикова Н.С., Титченко Ю.П. Хронический эндометрит: этиология, клиника, диагностика, лечение // Российский вестник акушера-гинеколога. 2013. Т. 13, № 5. С. 21–27. [Zarochentseva N.V., Arshakyan A.K., Menshikova N.S., Titchenko Yu.P. Chronic endometritis: etiology, clinic, diagnostics, treatment. *Rossiiskij vestnik akushera-ginekologa = Russian Bulletin Obstetrician-Gynecologist*, 2013, vol. 13, no. 5, pp. 21–27. (In Russ.)]
6. Кузнецова И.В., Землина Н.С., Рашидов Т.Н. Хронический эндометрит как исход инфекционного воспалительного заболевания матки // Гинекология. 2016. Т. 18, № 2. С. 44–50. [Kuznetsova I.V., Zemlina N.S., Rashidov T.N. Chronic endometritis as an outcome of an infectious inflammatory disease of the uterus. *Ginekologija = Gynecology*, 2016, vol. 18, no. 2, pp. 44–50. (In Russ.)]
7. Лысенко О.В., Занько С.Н. Гиперпластические процессы эндометрия в различные возрастные периоды: исследование цитокинового статуса и содержание SFAS-лиганда // Акушерство и гинекология. 2011. № 4. С. 63–68. [Lysenko O.V., Zanko S.N. Endometrial hyperplastic processes at different ages: study of cytokine status and SFAs-ligand levels. *Akusherstvo i ginekologija = Obstetrics and Gynecology*, 2011, no. 4, pp. 63–68. (In Russ.)]
8. Мальцева Л.И., Шарипова Р.И., Цыплаков Д.Э., Железова М.Е. Морфофункциональное состояние эндометрия у женщин с бактериально-вирусным эндометритом // Практическая медицина. 2017. Т. 7, № 108. С. 87–91. [Maltseva L.I., Sharipova R.I., Tsyplakov D.E., Zhelezova M.E. Morphofunctional state of the endometrium in women with bacterial-viral endometritis. *Prakticheskaja medicina = Practical Medicine*, 2017, vol. 108, no. 7, pp. 87–91. (In Russ.)]
9. Сндоян А.В. Состояние иммунной системы женщин с хроническим эндометритом (обзор литературы) // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2016. Т. 4, № 4. С. 711–715. [Sndoyan A.V. The state of the immune system of women with chronic endometritis (literature review). *Mezhdunarodnyj zhurnal prikladnyh i fundamental'nyh issledovanij = International Journal of Applied and Basic Research*, 2016, vol. 4, no. 4, pp. 711–715. (In Russ.)]
10. Сухих Г.Т., Шуршалина А.В. Хронический эндометрит. Руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. 64 с. [Sukhikh G.T., Shurshalina A.V. Chronic endometritis. Manual. Moscow: GEOTAR-Media, 2013. 64 p. (In Russ.)]
11. Ткаченко Л.В., Свиридова, Н.И. Двухэтапный метод лечения хронического эндометрита у женщин с гиперпластическими процессами эндометрия в перименопаузе // Гинекология. 2016. Т. 18, № 1. С. 40–44. [Tkachenko L.V., Sviridova N.I. Two-stage treatment of chronic endometritis in women with hyperplastic processes in perimenopaus. *Ginekologija = Gynecology*, 2016, vol. 18, no. 1, pp. 40–44. (In Russ.)]

12. Ткаченко Л.В., Свиридова Н.И. Современный подход к лечению гиперплазии эндометрия в сочетании с хроническим эндометритом в перименопаузе // Доктор.Ру. 2016. Т. 124, № 7. С. 15–20. [Tkachenko L.V., Sviridova N.I. Modern approach to the treatment of endometrial hyperplasia in combination with chronic endometritis in perimenopause. *Doktor.Ru = Doctor.Ru*, 2016, vol. 124, no. 7, pp. 15–20. (In Russ.)]
13. Armstrong A.J., Hurd W.W., Elguero S., Barker N.M., Zanotti K.M. Diagnosis and management of endometrial hyperplasia. *J. Minim. Invasive Gynecol.*, 2012, vol. 19, no. 5, pp. 562–571.
14. Berbic M., Ng C.H., Fraser I.S. Inflammation and endometrial bleeding. *Climacteric.*, 2014, no. 17, suppl. 2, pp. 47–53.
15. Kannar V., Kumar H., Lingaiah M., Sunita V. Evaluation of endometrium for chronic endometritis by using syndecan-1 in abnormal uterine bleeding. *J. Lab. Physicians.*, 2012, vol. 4, no. 2, pp. 69–73.
16. Wilson R.B. Hypoxia, cytokines and stromal recruitment: parallels between pathophysiology of encapsulating peritoneal sclerosis, endometriosis and peritoneal metastasis. *Pleura Peritoneum.*, 2018. doi: 10.1515/pp-2018-0103

**Авторы:**

**Ткаченко Л.В.**, д.м.н., профессор, зав. кафедрой акушерства и гинекологии факультета усовершенствования врачей ФГБОУ ВО Волгоградский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Волгоград, Россия;

**Свиридова Н.И.**, д.м.н., доцент, профессор кафедры акушерства и гинекологии факультета усовершенствования врачей 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;

**Бурова Н.А.**, к.м.н., доцент, доцент кафедры акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО Волгоградский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Волгоград, Россия;

**Белан Э.Б.**, д.м.н., профессор, зав. кафедрой иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Волгоградский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Волгоград, Россия.

**Authors:**

**Tkachenko L.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Advanced Medical Studies, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation;

**Sviridova N.I.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor of the Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Advanced Training of Doctors, 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;

**Burova N.A.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Associate Professor of the Department of Obstetrics and Gynecology, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation;

**Belan E.B.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Immunology and Allergology, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation.

# МОДЕЛИ CRF63\_02A6 ВИЧ-1 КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗРАБАТЫВАЕМЫХ АНТИРЕТРОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Д.П. Зырянова, Н.В. Богачева, А.В. Тотменин, Н.М. Гашникова

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

**Резюме.** Высокоактивная антиретровирусная терапия (АРВТ) позволяет не только контролировать инфекционный процесс у конкретного пациента, но и снижать риск распространения ВИЧ-инфекции в целом, поэтому одной из целей международного сообщества в рамках борьбы с распространением ВИЧ является максимально широкий охват инфицированных лиц АРВТ. Антиретровирусная терапия при ВИЧ-инфекции назначается пожизненно, в связи с этим эффективность лечения может снижаться за счет появления резистентных к терапии форм ВИЧ-1. В настоящее время во всем мире продолжается процесс разработки новых антиретровирусных препаратов, поэтому для оценки противовирусной эффективности перспективных лекарственных средств востребованными являются стандартные модели ВИЧ-1. Для достоверной оценки эффективности препаратов в отношении российских вариантов ВИЧ-1 в качестве модели вируса должны быть использованы геноварианты ВИЧ-1, широко распространенные на территории России. Недавно возникшая рекомбинантная форма CRF63\_02A6 ВИЧ-1 за последние годы распространилась на территориях России и в настоящее время является доминирующим вариантом, выявляемым среди ВИЧ-инфицированных лиц на значительной части Сибирского федерального округа: в Новосибирской, Томской, Омской, Кемеровской областях, Красноярском и Алтайском крае. Нами получены инфекционные изоляты CRF63\_02A6 ВИЧ-1, один из которых содержит мутации, снижающие чувствительность к применяемым ингибиторам обратной транскриптазы вируса, и инфекционные молекулярные клоны на основе вариантов CRF63\_02A6 ВИЧ-1, имеющих сродство к корецепторам CCR5 и CXCR4. Инфекционные изоляты и молекулярные клоны CRF63\_02A6 протестированы в качестве моделей для оценки эффективности антиретровирусных препаратов на примере препарата «Эфавиренз». Значение пятидесятипроцентной ингибирующей концентрации, определенной на моделях инфекционных молекулярных клонов ВИЧ-1 и изолята 18RU7056 ВИЧ-1, варьировалось от 0,27 до 0,46 нг/мл, что соответствует данным зарубежных авторов. Для резистентного к ненуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы 12RU6987 ВИЧ-1 подавления репликации для исследованных концентраций «Эфавиренза» не отмечалось, что подтверждает снижение чувствительности 12RU6987 ВИЧ-1 к «Эфавирензу» не менее чем в 10 000 раз. Результаты проведенных исследований показывают, что изолированные штаммы CRF63\_02A6 ВИЧ-1 и созданные на основе CRF63\_02A6 ВИЧ-1 инфекционные молекулярные клоны являются релевантными и взаимодополняющими инструментами для оценки эффективности разрабатываемых препаратов, направленных на подавление ВИЧ-1, в том числе вирусов, резистентных к ненуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы.

**Ключевые слова:** модель ВИЧ-1, CRF63\_02A6 ВИЧ-1, инфекционные изоляты ВИЧ-1, инфекционные молекулярные клоны ВИЧ-1, антиретровирусная терапия.

---

**Адрес для переписки:**

Гашникова Наталья Матвеевна  
630559, Россия, р.п. Кольцово, Новосибирской области,  
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.  
Тел.: 8 (383) 363-47-00, доп. 21-40 (служебн.); 8 913 940-54-79.  
E-mail: nmgashnikova@gmail.com

**Contacts:**

Natalya M. Gashnikova  
630559, Russian Federation, Koltsovo, Novosibirsk region,  
State Research Center of Virology and Biotechnology Vector.  
Phone: +7 (383) 363-47-00, add. 21-40 (office); +7 913 940-54-79.  
E-mail: nmgashnikova@gmail.com

**Библиографическое описание:**

Зырянова Д.П., Богачева Н.В., Тотменин А.В., Гашникова Н.М. Модели CRF63\_02A6 ВИЧ-1 как инструмент для оценки эффективности разрабатываемых антиретровирусных препаратов // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 4. С. 769–774. doi: 10.15789/2220-7619-MHC-1261

**Citation:**

Zyryanova D.P., Bogacheva N.V., Totmenin A.V., Gashnikova N.M. HIV-1 CRF63\_02A6 models as a tool for evaluating efficacy of developing antiretroviral drugs // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 4, pp. 769–774. doi: 10.15789/2220-7619-MHC-1261

## HIV-1 CRF63\_02A6 MODELS AS A TOOL FOR EVALUATING EFFICACY OF DEVELOPING ANTIRETROVIRAL DRUGS

Zyryanova D.P., Bogacheva N.V., Totmenin A.V., Gashnikova N.M.

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russian Federation

**Abstract.** Highly active antiretroviral therapy (HAART) allows not only to control the infection process in certain patient, but also to reduce a risk of HIV infection spreading in general, so that one of the goals for international community fighting against HIV-spread is to maximize coverage of infected subjects with HAART. Antiretroviral therapy in HIV infection is administered lifelong, so that therapeutic efficacy may be lowered due to emergence of resistant HIV-1 variants. Currently, development of new antiretroviral drugs is currently underway throughout the world, therefore standard HIV-1 models are demanded to evaluate antiviral efficacy of promising drugs. To reliably assess drug efficiency regarding Russia-wide HIV-1 variants, HIV-1 genovariants widespread in Russia should be used as a virus model. A recently emerged recombinant form of CRF63\_02A6 HIV-1 is spread in Russia being currently a dominant variant detected among HIV-infected individuals in an extended region of the Siberian Federal District: in the Novosibirsk, Tomsk, Omsk, Kemerovo Regions, Krasnoyarsk and Altai Krai. We have obtained CRF63\_02A6 infectious isolates of HIV-1, one of which contains mutations, reducing the sensitivity to the applied inhibitors of the virus reverse transcriptase. In addition, we constructed infectious molecular clones based on HIV-1 CRF63\_02A6 variants with an affinity for CCR5 coreceptors and CXCR4. Infectious isolates and molecular clones CRF63\_02A6 tested as models for assessing efficacy of antiretroviral drugs using the example of the drug "Efavirenz". The fifty percent inhibitory concentration determined on the models of HIV-1 infectious molecular clones and HIV-1 isolate 18RU7056 ranged from 0.00027 µg/ml to 0.00046 µg/ml being in agreement with data published elsewhere. Concentrations of "Efavirenz" used in the study did not suppress the replication of HIV-1 12RU6987, which is resistant to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, which confirms the decrease in the sensitivity of HIV-1 12RU6987 to "Efavirenz" by no less than 10,000 times. Thus, our data demonstrate that CRF63\_02A6 HIV-1 isolated strains and infectious molecular clones are relevant and complementary tools for assessing efficacy of developing drugs aimed at suppressing HIV-1, including non-nucleoside-resistant virus reverse transcriptase inhibitors.

**Key words:** model of the HIV-1, CRF63\_02A6 HIV-1, HIV-1 infectious isolates, HIV-1 infectious molecular clones, antiretroviral therapy.

## Введение

Заболеваемость ВИЧ-инфекцией во всем мире неуклонно растет. К июню 2017 г. общее число людей, живущих с ВИЧ, составляло 36,9 [31,1–43,9] млн человек [7]. По состоянию на 31 декабря 2018 г. кумулятивное количество зарегистрированных случаев ВИЧ-инфекции среди граждан Российской Федерации составило 1 326 239 человек (по предварительным данным) [2]. Одним из важнейших факторов, препятствующих распространению ВИЧ, является антиретровирусная терапия (АРВТ). Применение АРВТ дало возможность не только контролировать инфекционный процесс у конкретного индивидуума, но и снизить скорость распространения ВИЧ в целом. По данным исследований последних лет, неопределяемая вирусная нагрузка у ВИЧ-инфицированного (концентрация РНК ВИЧ-1 в периферической крови) препятствует передаче вируса половому партнеру [6]. В настоящее время в России разрешено к применению 26 антиретровирусных препаратов (не считая дженериков и лекарственных форм, содержащих несколько препаратов, называемых также препаратами с фиксированной комбинацией доз) [3].

Однако по ряду причин поиск новых противовирусных препаратов, эффективных в отношении ВИЧ, продолжается до сих пор. К таким причинам относятся наличие значимых побоч-

ных эффектов препаратов, необходимость использования препаратов пролонгированного действия, неэффективность препарата в отношении резистентных вирусов.

На раннем доклиническом этапе оценка эффективности препаратов проводится, как правило, *in vitro* с использованием различных модельных систем [8, 9].

В исследованиях применяются модели ВИЧ-1, культивируемые на различных клеточных линиях. К таким моделям ВИЧ-1 относятся изоляты, псевдовиральные частицы (псевдовirus), инфекционные молекулярные клоны. Каждая из моделей отражает существенные признаки своего прототипа в определенных рамках исследования.

Наиболее близкой по биологическим свойствам к «дикому» вирусу является модель ВИЧ, изолированного из клеток инфицированного человека и способного к эффективной репродукции на его первичных/перевиваемых клетках — инфекционный изолят/штамм ВИЧ [1]. В связи с тем, что в организме инфицированного ВИЧ-1 человека в процессе воспроизводства вируса за счет возникновения мутаций в вирусном геноме происходит его постоянное изменение, выделенный из крови ВИЧ-1 (изолят ВИЧ-1) представляет собой генетически неоднородную популяцию вирусов. Ввиду этого не всегда удастся при генотипировании вируса отследить начальный этап появления квазивидов ВИЧ-1

с мутациями устойчивости, когда количество таких вирусов со сниженной чувствительностью к лекарственным препаратам, присутствующих в организме инфицированного человека, составляет меньшинство. При каждом последующем пассаже ВИЧ-1 может происходить изменение соотношения квазивидов вирусного изолята, дальнейшее накопление мутаций, что влечет за собой изменение характеристик вируса по сравнению с его прототипом. Однако именно эта особенность данной модели (генетически разнородная популяция ВИЧ, имеющая определенный потенциал для возможности «ухода» от селективного давления препаратов или иммунной системы) и является основным преимуществом при выборе инструмента для первичного скрининга антиретровирусных средств. Коллекции изолятов ВИЧ представляют собой значительный арсенал биологического разнообразия при выборе модели для исследования с учетом биологических характеристик вируса. Поэтому необходимо использование изолятов ВИЧ-1 на доклинических этапах оценки эффективности антиретровирусных препаратов [15].

Другой моделью для скрининга новых антиретровирусных препаратов являются псевдовirusы ВИЧ-1 [4]. Псевдовirusы ВИЧ-1 генетически однородны, безопасны в применении, поскольку они способны лишь однократно инфицировать чувствительные клетки и не воспроизводятся в них, так как имеют дефектный вирусный геном. Следовательно, данная модель ВИЧ может быть использована во многих лабораториях, не требуя создания условий для работы с микроорганизмами I–II группы патогенности. Псевдовirusы ВИЧ-1 широко применяются на доклиническом этапе оценки эффективности препаратов [10], однако отобранные на основе таких исследований препараты необходимо дополнительно изучать с применением репликационно-компетентных моделей ВИЧ.

Инфекционные молекулярные клоны ВИЧ (ИМК) являются уникальной моделью, применяемой для широкого спектра исследований, так как ИМК ВИЧ объединяют некоторые необходимые для исследователей свойства двух предыдущих моделей. ИМК ВИЧ представляет собой плазмидную конструкцию, содержащую полногеномную последовательность вирусного генома [5, 14]. При трансфекции специальных культур эукариотических клеток такой плазмидой, содержащей полную копию ВИЧ, запускается синтез всех закодированных в геноме вирусных белков, вирусной РНК, происходит формирование и выход полноценных вирусов ВИЧ-1 в культуральную среду. Инфекционные ВИЧ-1, полученные на основе ИМК, полностью воспроизводят жизненный цикл вируса, имеют

идентичный геном, могут быть использованы для инфицирования любых культур клеток человека, чувствительных к ВИЧ-1.

ИМК ВИЧ-1, как и псевдовirusы ВИЧ-1, обеспечивают повышение уровня стандартизации исследований и воспроизводимости результатов за счет генетической однородности ВИЧ, известной структуры генома вируса, возможности наработки вируса с известными свойствами в любом количестве без накопления мутаций.

В отличие от модели псевдовirusов, модель ВИЧ-1 на основе ИМК предоставляет возможность направленной модификации вирусного генома, например введения мутаций, связанных с развитием устойчивости вируса к антиретровирусным препаратам (АРВП). Специально разработанные таким образом наборы/панели ИМК ВИЧ-1 могут служить моделью для оценки эффективности новых разрабатываемых средств в отношении вирусов, резистентных к определенным классам ингибиторов ВИЧ-1 [13].

Развитие резистентности ВИЧ-1 к лекарственным препаратам представляет собой сложный процесс отбора вирусов с разными комбинациями случайно возникших в геноме ВИЧ мутаций и мутаций, образующихся под давлением АРВП.

Снижение эффективности действия антиретровирусных препаратов на ВИЧ-1 зависит не только от наличия конкретных мутаций в геноме вируса, ответственных за развитие устойчивости к лекарственным препаратам. Существенное снижение чувствительности ВИЧ-1 может происходить при возникновении определенных комбинаций мутаций резистентности с другими мутациями, которые напрямую не влияют на чувствительность вируса к препарату. Такие мутации, называемые акцессорными, или вторичными, могут увеличивать репродуктивные свойства резистентных ВИЧ или синергетично влияют на снижение чувствительности вируса к АРВП.

Благодаря естественному полиморфизму в областях генома, кодирующих мишени для АРВП, разные генетические варианты ВИЧ-1 (субтипы ВИЧ-1) могут иметь мутации, дающие дополнительный потенциал возможностей ВИЧ-1 к снижению чувствительности к АРВП и уходу от терапии. Поэтому возникновение одних и тех же мутаций у генетически отличающихся вариантов вируса может приводить к развитию резистентности ВИЧ разного уровня [12]. При появлении новых рекомбинантных форм ВИЧ-1 могут образоваться уникальные сочетания генов, эффект которых на фенотипические свойства, в том числе на чувствительность к тем или иным антиретровирусным препаратам, до определенного времени остается

не известен. В связи с этим для достоверного исследования эффективности новых антиретровирусных препаратов важно использование моделей ВИЧ-1, отражающих актуальную эпидемиологическую ситуацию.

В настоящее время доминирующим субтипом ВИЧ-1, определяемым более чем в 70% случаев диагностирования ВИЧ-инфекции на территориях Новосибирской, Томской, Кемеровской областях, в Алтайском крае, является недавно возникший вирус — циркулирующая рекомбинантная форма CRF63\_02A6 ВИЧ-1. В связи с высокой распространенностью этого геноварианта вируса модели CRF63\_02A6 ВИЧ-1 являются актуальными при разработке антиретровирусных препаратов для населения России.

Сотрудниками ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора создана коллекция инфекционных изолятов ВИЧ-1 (включая ВИЧ-1 CRF63\_02A6 и вирусы, содержащие мутации лекарственной устойчивости), которая в настоящее время используется для скрининга противовирусной эффективности разрабатываемых лекарственных препаратов [1].

На основе изолятов ВИЧ-1 из этой коллекции нами сконструировано два ИМК CRF63\_02A6 ВИЧ-1, которые также, как и изоляты ВИЧ-1, могут быть использованы для оценки эффективности разрабатываемых АРВП как альтернативная, более стандартизованная система.

Целью настоящей работы являлось тестирование ИМК и изолятов CRF63\_02A6 ВИЧ-1 в качестве моделей для оценки эффективности антиретровирусного препарата на примере эфавиренза.

## Материалы и методы

Для получения генетически однородных вирусных частиц CRF63\_02A1 ВИЧ-1 были использованы сконструированные нами ранее ИМК pT11.17 ВИЧ-1 (GenBank: MK984160) и pMtBs.18 ВИЧ-1 (GenBank: MK984159). Проведена трансфекция культуры клеток НЕК293Т соответствующими плазмидными конструкциями (5000 нг плазмиды/флакон T25 со сплошностью клеток 90%) с использованием реагента Липофектамин 2000 (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, США). Через 2 суток после трансфекции выявление вирусного белка р24 методом иммуноферментного анализа (ИФА) коммерческим набором ВИЧ-1 р24-антиген-ИФА-БЕСТ (Вектор-Бест, Новосибирск, РФ) подтвердило наличие ВИЧ-1 в культуральной жидкости обоих образцов. Полученная вирусосодержащая культуральная жидкость была использована для заражения T11.17 ВИЧ-1 и MtBs.18 ВИЧ-1 периферических мононуклеарных клеток крови человека (РВМС). При культивировании полученных T11.17 ВИЧ-1

и MtBs.18 ВИЧ-1 на периферических мононуклеарных клетках крови человека (РВМС) на 10 сут был отмечен прирост концентрации р24 в обоих образцах более чем в тысячу раз по сравнению с исходной концентрацией в 1 сутки культивирования, что свидетельствует о получении репликационно компетентных ВИЧ-1.

T11.17 ВИЧ-1 и MtBs.18 ВИЧ-1 были использованы для оценки противовирусной эффективности лекарственных препаратов на примере «Эфавиренза». Параллельно, для сравнительной оценки на РВМС проводили культивирование двух изолятов ВИЧ-1 из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора 12RU6987 и 18RU7056. Оба изолята ВИЧ-1 имеют тропизм к ССR5 корцепторам и относятся к геноварианту CRF63\_02A6 ВИЧ-1. Кроме того, 12RU6987 содержит мутации устойчивости к ненуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы L100I, K103N, H221Y.

Для оценки эффективности «Эфавиренза», относящегося к группе селективных ненуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ-1, получали культуру РВМС, выделенную от двух здоровых доноров. Выделение РВМС и стимуляция клеток в культуральной среде, содержащей фитогемагглютинин, проводились по методике, описанной ранее [1]. Заражение клеток ВИЧ-1 (T11.17 ВИЧ-1, MtBs.18 ВИЧ-1, а также изолятами ВИЧ-1 12RU6987, 18RU7056) осуществляли по стандартной методике. Инкубация РВМС с вирусосодержащим материалом проводилась в течение 1 часа. После инкубации клеток с ВИЧ-1 РВМС были отмыты чистой средой и посеяны в 96-луночный планшет с посевной дозой клеток  $4 \times 10^5$  клеток на лунку. В лунки была добавлена полная ростовая среда (RPMI 1640, фетальная сыворотка крупного рогатого скота 20%, L-глутамин 150 мг/мл, пенициллин/стрептомицин 50 мкг/мл, интерлейкин 100 е.а./мл) до рабочего объема 200 мкл, содержащая «Эфавиренз» в конечных концентрациях от 5 мкг/мл до 0,085 нг/мл на лунку (11 последовательных разведений с 3-кратным уменьшением концентрации). Нижний диапазон концентраций был выбран с учетом данных исследований «Эфавиренза» другими авторами, максимальная концентрация, отличавшаяся более чем на пять порядков, была взята для того, чтобы определить кратность снижения чувствительности к «Эфавиренза» изолята ВИЧ-1, содержащего описанный выше набор мутаций резистентности.

Культивирование разных вариантов ВИЧ-1 (изолятов и ИМК) проводилось при 37°C в CO<sub>2</sub> инкубаторе в течение 7 дней в 3 повторях для каждой из моделей ВИЧ-1. Оценку подавления репликации ВИЧ-1 выполняли путем измерения накопления вирусного белка р24 в куль-

### Таблица. Ингибирующий эффект «Эфавиренза» на репродукцию ВИЧ-1 (инфекционных молекулярных клонов ВИЧ-1 и изолятов ВИЧ-1) в культуре РВМС

Table. The inhibition effect of “Efavirenz” on HIV-1 reproduction (HIV-1 infectious molecular clones, HIV-1 infectious isolates) in PBMC culture

Модель ВИЧ HIV-1 model	IC <sub>50</sub> (нг/мл) IC <sub>50</sub> (ng/ml)	95% доверительный интервал (нг/мл) IC <sub>50</sub> CL 95% profile likelihood (ng/ml)
<b>T11.17</b>	0,2787	0,2606–0,2965
<b>MtBs.18</b>	0,2700	0,2032–0,3539
<b>18RU7056</b>	0,4626	0,3586–0,5920
<b>12RU6987</b>	> 5000	

**Примечание.** Результаты IC<sub>50</sub> представляют собой среднюю степень ингибирования в дублирующих экспериментах.

Note. The results IC<sub>50</sub> are the mean inhibition rate in duplicate experiments.

туральной жидкости в сравнении с контролем роста вируса набором ВИЧ-1 р24-антиген-ИФА-БЕСТ (Вектор-Бест, Новосибирск, РФ). Значение 50% ингибирующей ВИЧ-1 концентрации «Эфавиренза» (IC<sub>50</sub>) рассчитывали с помощью нелинейного регрессионного анализа.

### Результаты и обсуждение

На 7 сутки культивирования ВИЧ-1 (изолятов и ИМК ВИЧ-1) в культуральной среде, содержащей разные концентрации «Эфавиренза», была отобрана культуральная жидкость, инактивирована добавлением раствора Tween80 до конечной концентрации 0,1%. По результатам ИФА и оценки накопления вирусспецифического белка р24 в среде были определены значения IC<sub>50</sub> для «Эфавиренза» на каждой из моделей (табл.).

Значение IC<sub>50</sub> «Эфавиренза» в отношении инфекционных молекулярных клонов ВИЧ-1 и изолята 18RU7056 ВИЧ-1 варьировало от 0,27 нг/мл до 0,46 нг/мл, что соответствует данным других авторов, согласно которым средний показатель IC<sub>50</sub> «Эфавиренза» к разным штаммам ВИЧ составляет 0,51 нг/мл [11].

В экспериментальных образцах с резистентным к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы изолятом 12RU6987 ВИЧ-1 подавления репликации ВИЧ-1 для исследованных концентраций «Эфавиренза» не отмечалось. Концентрация р24 в лунках со всеми

разведениями «Эфавиренза» соответствовала уровню контроля роста вируса, что подтверждает снижение чувствительности 12RU6987 ВИЧ-1 к «Эфавирензу» не менее чем в 10 000 раз.

Результаты проведенных исследований показывают, что изолированные штаммы CRF63\_02A6 ВИЧ-1 и созданные на основе CRF63\_02A6 ВИЧ-1 инфекционные молекулярные клоны являются релевантными и взаимодополняющими инструментами для оценки эффективности разрабатываемых антиретровирусных препаратов.

Представленные в работе модели ВИЧ-1 на основе генетического варианта CRF63\_02A6 ВИЧ-1, циркулирующего в России, могут быть успешно использованы для оценки эффективности разрабатываемых антиретровирусных препаратов.

Современные технологии направленного мутагенеза позволяют вводить конкретные изменения в геном ВИЧ. Поэтому полученные нами ИМК CRF63\_02A6 ВИЧ-1, дающие потомство генетически однородной популяции вирусов с известной структурой генома, являются также моделью, позволяющей исследовать взаимосвязь изменения структуры и функции отдельных генов ВИЧ, изучать субтип-специфические особенности ВИЧ-1, вклад отдельных мутаций ВИЧ-1 и их комбинаций в развитие резистентности вируса к применяемым в клинической практике антиретровирусным препаратам.

### Список литературы/References

1. Богачева Н.В., Бледных Н.А., Тотменин А.В., Мирджамалова Ф.О., Соколов Ю.В., Гашникова Н.М. Создание коллекции современных изолятов ВИЧ-1, включающей основные российские генетические варианты вируса // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2017. Т. 9, № 1. С. 65–76. [Bogacheva N.V., Blednyh N.A., Totmenin A.V., Mirdzhamalova F.O., Sokolov J.V., Gashnikova N.M. Creation of a collection of up-to-date HIV-1 isolates including major russian genetic variants of virus. *VICH-infektsiya i immunosuppressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*, 2017, vol. 9, no. 1, pp. 65–76. doi: 10.22328/2077-9828-2017-9-1-65-76 (In Russ.)]
2. ВИЧ-инфекция в Российской Федерации в 2018 г. М.: ФБУН Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, 2018. [HIV infection in the Russian Federation in 2018. Moscow: Central Research Institute of Epidemiology of The Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-being Surveillance, 2018]. URL: <http://www.aids43.ru/stat>
3. Покровский В.В., Юрин О.Г., Кравченко А.В., Беляева В.В., Ермак Т.Н., Канестри В.Г., Шахильдян В.И., Козырина Н.В., Буравцова В.В., Нарсия Р.С., Хохлова О.Н., Покровская А.В., Ефремова О.С., Коннов В.В., Куимова У.А., Попова А.А., Воронин Е.Е., Афонина Л.Ю., Васильева И.А., Зимица В.Н. Национальные рекомендации по диспансер-

- ному наблюдению и лечению больных ВИЧ-инфекцией. Клинический протокол // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2017. № 6. [Pokrovsky V.V., Yurin O.G., Kravchenko A.V., Belyaeva V.V., Ermak T.N., Kanestri V.G., Shakhgildyan V.I., Kozyrina N.V., Buravtsova V.V., Narsia R.S., Khokhlova O.N., Pokrovskaya A.V., Efremova O.S., Konnov V.V., Kuimova U.A., Popova A.A., Voronin E.E., Afonina L.Yu., Vasilieva I.A., Zimina V.N. National guidelines for follow-up and treatment of HIV patients. Clinical protocol. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy = Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items, 2017, vol. 6 (suppl.) (In Russ.)*]
4. Прокофьева М.М., Спирин П.В., Январев Д.В., Иванов А.В., Новиков М.С., Степанов О.А., Готтих М.Б., Кочетков С.Н., Fehse B., Stocking C., Прасолов В.С. Скрининг потенциальных ингибиторов/блокаторов репликации ВИЧ-1 с помощью безопасной лентивирусной системы in vitro // Acta Naturae. 2011. Т. 3, № 4. С. 57–67. [Prokofjeva M.M., Spirin P.V., Yanvarev D.V., Ivanov A.V., Novikov M.S., Stepanov O.A., Gottikh M.B., Kochetkov S.N., Fehse B., Stocking C., Prassolov V.S. Screening of potential HIV-1 inhibitors/replication blockers using secure lentiviral in vitro system. *Acta Naturae, 2011, vol. 3, no. 4, pp. 57–67. (In Russ.)*]
  5. Baalwa J., Wang S., Parrish N.F., Decker J.M., Keele B.F., Learn G.H., Yue L., Rugazigira E., Ssemwanga D., Kamali A. Molecular identification, cloning and characterization of transmitted/founder HIV-1 subtype A, D and A/D infectious molecular clones. *Virology, 2013, vol. 436, no. 1, pp. 33–48. doi: 10.1016/j.virol.2012.10.009*
  6. Cohen M.S., Chen Y.Q., McCauley M., Gamble T., Hosseinipour M.C., Kumarasamy N., Hakim J.G., Kumwenda J., Grinsztejn B., Pilotto J.H., Godbole S.V., Chariyalertsak S., Santos B.R., Mayer K.H., Hoffman I.F., Eshleman S.H., Piwowar-Manning E., Cottle L., Zhang X.C., Makhema J., Mills L.A., Panchia R., Faesen S., Eron J., Gallant J., Havlir D., Swindells S., Elharrar V., Burns D., Taha T.E., Nielsen-Saines K., Celentano D.D., Essex M., Hudelson S.E., Redd A.D., Fleming T.R. HPTN 052 Study Team. Antiretroviral therapy for the prevention of HIV-1 transmission. *N. Engl. J. Med., 2016, vol. 375, no. 9, pp. 830–839. doi:10.1056/nejmoa1600693*
  7. Global HIV & AIDS statistics — 2018 fact sheet UNAIDS. URL: [http://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/UNAIDS\\_FactSheet\\_ru.pdf](http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_FactSheet_ru.pdf)
  8. Harman S., Herrera C., Armanasco N., Nuttall J., Shattock R.J. Preclinical evaluation of the HIV-1 fusion inhibitor L'644 as a potential candidate microbicide. *Antimicrob. Agents Chemother., 2012, vol. 56, no. 5, pp. 4381–4390. doi: 10.1128/AAC.06108-11*
  9. Kobayashi M., Yoshinaga T., Seki T., Wakasa-Morimoto C., Brown K.W., Ferris R., Foster S.A., Hazen R.J., Miki S., Suyama-Kagitani A., Kawauchi-Miki S. In vitro antiretroviral properties of S/GSK1349572, a next-generation HIV integrase inhibitor. *Antimicrob. Agents Chemother., 2011, vol. 55, no. 2, pp. 813–821. doi: 10.1128/AAC.01209-10*
  10. Marsden M.D., Avancena P., Kitchen C.M., Hubbard T., Zack J.A. Single mutations in HIV integrase confer high-level resistance to raltegravir in primary human macrophages. *Antimicrob. Agents Chemother., 2011, vol. 55, no. 8, pp. 3696–3702. doi: 10.1128/AAC.00566-11*
  11. Parkin N.T., Hellmann N.S., Whitcomb J.M., Kiss L., Chappey C., Petropoulos C.J. Natural variation of drug susceptibility in wild-type human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob. Agents Chemother., 2004, vol. 48, no. 2, pp. 437–443. doi:10.1128/aac.48.2.437-443.2004*
  12. Quashie P.K., Oliviera M., Veres T., Osman N., Han Y.S., Hassounah S., Lie Y., Huang W., Mesplède T., Wainberg M.A. Differential effects of the G118R, H51Y, and E138K resistance substitutions in different subtypes of HIV integrase. *J. Virol., 2015, vol. 89, no. 6, pp. 3163–3175. doi: 10.1128/JVI.03353-14*
  13. Reuman E.C., Bachmann M.H., Varghese V., Fessel W.J., Shafer R.W. Panel of prototypical raltegravir-resistant infectious molecular clones in a novel integrase-deleted cloning vector. *Antimicrob. Agents Chemother., 2010, vol. 54, no. 2, pp. 934–936. doi: 10.1128/AAC.01345-09*
  14. Rodriguez M.A., Chen Y., Craig J.K., Chatterjee R., Ratner D., Tatsumi M., Roy P., Neogi D., Gupta P. Construction and characterization of an infectious molecular clone of HIV-1 subtype A of Indian origin. *Virology, 2006, vol. 345, pp. 328–336. doi: 10.1016/j.virol.2005.09.053*
  15. Uckun F.M., Cahn P., Qazi S. Stampidine as a promising antiretroviral drug candidate for pre-exposure prophylaxis against sexually transmitted HIV/AIDS. *Expert Opin. Investig. Drugs, 2012, vol. 21, no. 4, pp. 489–500. doi: 10.1517/13543784.2012.664635*

**Авторы:**

**Зырянова Д.П.**, младший научный сотрудник отдела ретровирусов ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

**Богачева Н.В.**, младший научный сотрудник отдела ретровирусов ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

**Тотменин А.В.**, к.б.н., зав. лабораторией отдела ретровирусов ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

**Гашникова Н.М.**, к.б.н., зав. отделом ретровирусов ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, п. Кольцово, Новосибирская область, Россия.

**Authors:**

**Zyryanova D.P.**, Junior Researcher, Department of Retroviruses, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russian Federation;

**Bogacheva N.V.**, Junior Researcher, Department of Retroviruses, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russian Federation;

**Totmenin A.V.**, PhD (Biology), Head of the Laboratory, Department of Retroviruses, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russian Federation;

**Gashnikova N.M.**, PhD (Biology), Head of the Department of Retroviruses, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russian Federation.

Поступила в редакцию 21.08.2019  
Отправлена на доработку 26.11.2019  
Принята к печати 11.03.2020

Received 21.08.2019  
Revision received 26.11.2019  
Accepted 11.03.2020

# КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПНЕВМОНИЙ НА ФОНЕ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ И ИХ СВЯЗЬ С НАЛИЧИЕМ ИЛИ ОТСУТСТВИЕМ АКТИВНОЙ НАРКОТИЧЕСКОЙ ЗАВИСИМОСТИ

Л.В. Пузырева, А.В. Мордык, М.А. Панева

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

**Резюме.** Бактериальные пневмонии занимают второе место после туберкулеза органов дыхания у пациентов с ВИЧ-инфекцией. В последние годы половой путь передачи ВИЧ сменил инъекционный при потреблении наркотических средств. Представляется актуальным совершенствование оказания помощи больным ВИЧ-инфекцией и бактериальными пневмониями в зависимости от факта потребления психоактивных веществ. Цель исследования — оценка клинических и иммунологических проявлений бактериальных пневмоний на фоне ВИЧ-инфекции в зависимости от установленного факта потребления инъекционных наркотиков пациентом. **Материалы и методы.** Ретроспективно проанализированы клинические, иммунологические данные 224 пациентов с ВИЧ-инфекцией и пневмониями: 1 группу составили 70 больных ВИЧ-инфекцией, потребителей инъекционных наркотиков (ПИН) с установленной этиологией бактериальной пневмонии; 2 группу — 16 ПИН с ВИЧ-инфекцией и пневмониями неустановленной этиологии; 3 группу — 65 больных с ВИЧ и бактериальными пневмониями установленной этиологии без ПИН; 4 группу — 73 больных с ВИЧ-инфекцией и бактериальными пневмониями неустановленной этиологии, не употреблявших инъекционные наркотики. Полученные данные обработаны с помощью программного средства «Statistica 13.3». Использовались методы описательной статистики с вычислением непараметрического критерия — ранговый дисперсионный анализ Краскела–Воллиса (H-критерий) и расчетом  $\chi^2$ . **Результаты.** Иммунологические проявления ВИЧ-инфекции и бактериальных пневмоний характеризуются снижением CD4<sup>+</sup> клеток и повышением CD3<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток, в большей степени выраженным у лиц, не являющихся потребителями инъекционных наркотиков, у них же зарегистрированы наиболее высокие величины вирусной нагрузки при развитии пневмонии. Бактериальные пневмонии на фоне ВИЧ-инфекции не отличаются по клиническим проявлениям у лиц, не потреблявших и потребляющих инъекционные наркотики; в 10% случаев они протекают на фоне нормотермии. Для пациентов употребляющих наркотические средства, клиника пневмонии зачастую была схожа с симптомами сепсиса в виде боли во всем теле, мышцах, ломоты в костях, что не характерно для ВИЧ-инфицированных, заразившихся половым путем. Также в этой группе пациентов чаще выслушивался систолический шум на верхушке сердца при аускультации. **Заключение.** Следует привлекать к обследованию на ВИЧ лиц с риском половой передачи инфекции, считающих себя здоровыми. В приемных отделениях не отказывать в госпитализации и проводить рентгенологическое исследование всем лицам с симптомами поражения нижних дыхательных путей.

**Ключевые слова:** ВИЧ-инфекция, инфекции нижних дыхательных путей, пневмония, потребители инъекционных наркотиков.

---

**Адрес для переписки:**

Пузырева Лариса Владимировна  
644099, Россия, г. Омск, ул. Ленина, 12,  
Омский государственный медицинский университет.  
Тел.: 8 (3812) 95-70-02. E-mail: puzirevalv@mail.ru

**Contacts:**

Larisa V. Puzyreva  
644099, Russian Federation, Omsk, Lenin str., 12,  
Omsk State Medical University.  
Phone: +7 (3812) 95-70-02. E-mail: puzirevalv@mail.ru

**Библиографическое описание:**

Пузырева Л.В., Мордык А.В., Панева М.А. Клинико-иммунологические характеристики бактериальных пневмоний на фоне ВИЧ-инфекции и их связь с наличием или отсутствием активной наркотической зависимости // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 4. С. 775–781. doi: 10.15789/2220-7619-KIC-1222

**Citation:**

Puzyryova L.V., Mordyk A.V., Paneva M.A. Clinical and immunological characteristics of bacterial pneumonia associated with HIV infection coupled to drug addiction // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 4, pp. 775–781. doi: 10.15789/2220-7619-KIC-1222

## CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL CHARACTERISTICS OF BACTERIAL PNEUMONIA ASSOCIATED WITH HIV INFECTION COUPLED TO DRUG ADDICTION

Puzyryova L.V., Mordyk A.V., Paneva M.A.

Omsk State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Omsk

**Abstract.** Bacterial pneumonia holds the second place after respiratory tuberculosis in patients with HIV infection. In recent years, sexual transmission of HIV was replaced by injection drug route. It seems of high relevance to advance medical aid to patients with HIV infection and bacterial pneumonia depending on psychoactive substance use. Aim of study — assessment of clinical and immunological manifestations of bacterial pneumonia coupled to HIV infection with respect to verified injection drug use. *Materials and methods.* Clinical and immunological data collected from 224 patients with HIV infection and pneumonia were retrospectively analyzed: group 1 group — 70 patients with HIV infection, IDU, verified bacterial pneumonia; group 2 — 16 injecting drug users (IDU) with HIV infection and pneumonia of unverified etiology; group 3 — 65 patients with HIV and bacterial pneumonia of verified etiology without injection drug use, group 4 — 73 patients with HIV infection and bacterial pneumonia of unverified etiology, without injection drug use. The data obtained were analyzed by using software Statistica 13.3. Methods of descriptive statistics with calculation of nonparametric criterion — the Kruskal–Wallis test (H-criterion) and  $\chi^2$  test — were used. *Results.* Immunological manifestations of HIV infection and bacterial pneumonia were characterized by decreased count of CD4<sup>+</sup> cells paralleled with increased count of CD3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells at higher magnitude without injection drug use being also featured with peak viral load upon developing pneumonia. Bacterial pneumonia coupled to HIV infection showed clinical manifestations similar both in injecting drug users and non-users, proceeding in 10% cases during normothermia. Injection drug user patients often demonstrated clinical picture of pneumonia resembling those found in sepsis such as pain in the body, muscles, bone aches untypical to HIV-sexually infected subjects. In addition, systolic murmur on a heart top was more often auscultated in this patient group. *Conclusion.* Subjects self-considered healthy being at risk of sexually transmitted infections should be examined for HIV. All subjects manifested with symptoms of the lower airway tract infections in admission department should not be rejected to be hospitalized and undergo chest X-ray examination.

**Key words:** HIV infection, lower respiratory tract infections, pneumonia, injecting drug users.

### Введение

В России проблема ВИЧ-инфекции представляется наиболее актуальной в инфектологии в связи со значительным распространением ВИЧ во многих регионах страны с невыраженными до настоящего времени темпами ее сдерживания. При этом болезни органов дыхания, и в частности инфекции нижних дыхательных путей, у этих пациентов выходят на первый план по числу обращений и госпитализаций в учреждения первичной медико-санитарной и специализированной помощи [3, 4, 7].

Особенности этиологического агента обусловлены выраженностью иммунодефицита у этих больных и определяют варианты клинических проявлений с наклоном к затяжному течению, отличные от таковых у лиц без ВИЧ-инфекции [3, 4, 6, 7], а это ведет к сложностям диагностики, дифференциальной диагностики и лечения данной категории пациентов.

В настоящее время более половины больных ВИЧ-инфекцией заражаются половым путем. Эпидемия вышла за пределы группы лиц, активно потребляющих инъекционные наркотики (ПИН), в среду социально сохраняемых граждан, зараженных половым путем [5, 6]. Представляет научный и практический интерес оценка клинических и иммунологических проявлений бактериальных пневмоний на фоне ВИЧ-инфекции в зависимости от установлен-

ного факта потребления инъекционных наркотиков для последующего совершенствования диагностики и лечения пневмоний у пациентов с ВИЧ-инфекцией.

Цель исследования — оценка клинических и иммунологических проявлений бактериальных пневмоний на фоне ВИЧ-инфекции в зависимости от установленного факта потребления инъекционных наркотиков пациентом.

### Материалы и методы

Ретроспективно проанализированы клинические, иммунологические данные ВИЧ-инфицированных пациентов с различными бактериальными пневмониями. Данные были предоставлены Бюджетными учреждениями здравоохранения Омской области (БУЗОО) «Инфекционная клиническая больница № 1 им. Д.М. Далматова», «Областная клиническая больница», «Клинический медико-хирургический центр». Всего проанализировано 224 истории болезни.

Все ВИЧ-инфицированные пациенты с бактериальной пневмонией были разделены на 4 группы в зависимости от потребления инъекционных наркотиков и обнаружения этиологического агента, вызвавшего пневмонию, различными способами (культуральный метод, метод ПЦР-диагностики) [2]. Факт потребления наркотических препаратов подтвержден при сборе

анамнеза, при осмотре больного на наличие следов инъекций, пахового «колодца», по данным ЭХОКГ о наличии признаков бактериального эндокардита.

- 1 группа — ВИЧ-инфицированные пациенты, ПИН, с бактериальной пневмонией установленной этиологии (n = 70);
- 2 группа — ВИЧ-инфицированные ПИН с бактериальной пневмонией неустановленной этиологии (n = 16);
- 3 группа — ВИЧ-инфицированные пациенты с бактериальной пневмонией установленной этиологии, не являющиеся ПИН (n = 65);
- 4 группа — ВИЧ-инфицированные пациенты с бактериальной пневмонией неустановленной этиологии, не являющиеся ПИН (n = 73).

Мужчин в сравниваемых группах было 55,7; 56,3; 67,7 и 58,9% ( $\chi^2 = 2,267$ ; p = 0,519). Медиана возраста в 1 группе составила 34 года, во 2 — 36 лет, в 3 и 4 группах — 36 и 37 лет соответственно (H = 7,183; p = 0,066).

ВИЧ-инфекция была выявлена до настоящего заболевания у 94,3; 100,0; 100,0 и 84,9% пациентов в сравниваемых группах ( $\chi^2 = 15,13$ ; p = 0,002), у остальных больных она выявлена при поступлении в стационар во время данного эпизода заболевания. Это были трое пациентов 1 группы (4,3%) и 11 пациентов 4 группы (15,1%) исследований.

Данные были сгруппированы в таблицу Excel и для объективности «зашифрованы». Полученные данные обработаны с помощью программного средства «Statistica 13.3». В связи с наличием распределения, отличного от нормального, применен метод описательной статистики с вычислением непараметрического критерия — ранговый дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса (H-критерий). Рассчитывался  $\chi^2$ , критическое значение которого при уровне значимости p = 0,01 составляло 11,345. Для оценки влияния изучаемых переменных на заданный параметр использовался дискриминантный анализ (F-критерий). Связь между факторным и результативным признаками статистически значима при уровне значимости p < 0,05 [1].

## Результаты

Основными возбудителями бактериальных пневмоний в 1 группе были: *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *H. influenza*, *S. pyogenes* как в моно-, так и в микст-бактериальных сочетаниях. В группе пациентов, не являющихся ПИН, пневмонии чаще вызывались *K. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *H. influenza*, *P. aeruginosa*, *S. viridans*, *S. mitis*, *S. pyogenes*. Во 2 и 4 группах бактериальные пневмонии вызывались Грам(+) кокками.

При анализе наличия зависимостей от таких психоактивных веществ, как табак и алкоголь, установлено, что более половины пациентов во всех группах имели данные пристрастия: курили 71,4; 75,0; 75,4 и 58,9% пациентов ( $\chi^2 = 5,15$ ; p = 0,162), употребляли алкоголь 61,4; 25,0; 69,2 и 45,2% больных в сравниваемых группах соответственно ( $\chi^2 = 15,13$ ; p = 0,002).

При поступлении в стационар всем ВИЧ-инфицированным пациентам проводилось иммунологическое обследование по согласованию с сотрудниками регионального Центра СПИД. Наиболее высокая вирусная нагрузка была отмечена в группе пациентов, не являющихся ПИН, с бактериальной пневмонией установленной этиологии — по Me 918 412 копий/мл. В этой же группе отмечено низкое содержание CD4<sup>+</sup> лимфоцитов (по Me 84 кл/мкл) и их процентное соотношение к лейкоцитам (по Me 11%). В 4 группе также отмечалось низкое количество CD4<sup>+</sup> лимфоцитов (по Me 86 кл/мкл) и их процент (по Me 11%). Количество CD3<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> было максимальным в 1, 3 и 4 группах пациентов (p = 0,005; p = 0,016) (табл. 1).

Согласно клинической классификации ВИЧ-инфекции, принятой в РФ, пациенты с 3 субклинической стадией наиболее чаще регистрировались во 2 (50,0%) и в 1 (22,9%) группах. В 3 и 4 группах преобладали пациенты со стадиями вторичных заболеваний. Иногда стадии ВИЧ-инфекции были не установлены в связи с отсутствием динамического наблюдения в Центре СПИД, впервые выявленной инфекцией или быстрой смертью пациента, когда обследование не было сделано или не был получен результат. Наибольшая доля таких пациентов была в группе ВИЧ-инфицированных больных, не являющихся ПИН, с бактериальными пневмониями неустановленной этиологии ( $\chi^2 = 15,55$ ; p = 0,002).

На момент госпитализации в стационар большая часть пациентов каждой из групп принимала АРТ: 91,4; 87,5; 89,5 и 91,8% соответственно ( $\chi^2 = 7,201$ ; p > 0,05). За время лечения часть пациентов прекратила прием АРТ. Таких пациентов в 1 группе было 3 из 6 человек с АРТ, в 3 группе прекратили АРТ 4 пациента из 7, считая, что препараты не эффективны, и это явилось причиной их поступления в стационар с инфекцией нижних дыхательных путей. При этом во 2 группе АРТ принимали лишь 2 пациента, они же продолжили прием, в 4 группе АРТ принимали 6 пациентов, продолживших прием препаратов на фоне заболевания.

Одним из частых сопутствующих заболеваний у ВИЧ-инфицированных пациентов был вирусный гепатит С. В 1 группе было 78,6% (55) таких пациентов, во 2 — 75,0% (12), в 3 — 67,7% (44), в 4 — 65,8% (48) больных ( $\chi^2 = 7,815$ ; p = 0,307).

**Таблица 1. Иммунологические показатели в группах исследования, Ме**

Table 1. Immunological indicators in groups of a research, Me

Признак Sign	1 группа 1 group (n = 70)	2 группа 2 group (n = 16)	3 группа 3 group (n = 65)	4 группа 4 group (n = 73)	Н/р
Вирусная нагрузка Viral load	87 066	65 057	918 412	65 006	24,016/0,0000
CD4 <sup>+</sup> , абс.	219	347,5	84	86	14,336/0,002
CD4 <sup>+</sup> , %	22,5	27	11	11	8,846/0,031
CD3 <sup>+</sup> , абс.	592	249	629,5	508	12,81/0,005
CD3 <sup>+</sup> , %	73	62	78	77	5,36/0,147
CD8 <sup>+</sup> , абс.	495	233,5	548	265	10,296/0,016
CD8 <sup>+</sup> , %	55	52,5	64	53	10,133/0,017
ИРИ/IRI	0,24	0,24	0,22	0,19	2,594/0,458

При оценке клинических проявлений у пациентов с ВИЧ-инфекцией и бактериальными пневмониями выяснено, что лихорадка присутствовала у большинства, но не у всех пациентов ( $p = 0,173$ ). Так, у 12,9% больных в 1 группе, 10,8% больных в 3 группе и у 19,2% больных в 4 группе диагноз пневмонии был выставлен при нормальной температуре тела (табл. 3).

На слабость и недомогание предъявляла жалобы большая часть больных с ВИЧ-инфекцией и пневмониями. Снижение или отсутствие аппетита чаще отмечено пациентами 1, 3 и 4 групп — 64,3; 75,3 и 57,6% ( $p < 0,01$ ). Боли в мышцах и суставах чаще имели место у больных 1 группы — 32,9% ( $p = 0,01$ ).

Кашель отмечали более 60% больных ВИЧ-инфекцией с развившимися бактериальными пневмониями, при этом у пациентов 1, 2 и 4 групп несколько чаще он был влажным, пациенты 3 группы чаще предъявляли жалобы на сухой кашель. Одышка несколько чаще встречалась у больных в 1, 3 и 4 группах ( $p > 0,05$ ). Боли в грудной клетке отмечали более 60% пациентов сравниваемых групп ( $p > 0,05$ ).

Учитывались симптомы, присутствовавшие у больных, но не относящиеся к проявлениям инфекций нижних дыхательных путей. На го-

ловную боль чаще предъявляли жалобы пациенты 1 группы, ПИН с бактериальными пневмониями установленной этиологии ( $p = 0,009$ ). Головокружение имелось у 10–15% больных в 1, 3 и 4 группах. Тошнота встречалась редко, чуть чаще у пациентов 3 группы ( $p = 0,083$ ). Рвота была у каждого четвертого пациента во 2 группе ( $p = 0,005$ ). Боли в животе чаще отмечались у пациентов с пневмониями и ВИЧ-инфекцией, не относящихся к категории ПИН ( $p = 0,078$ ). Диарея имела место у 15–23% пациентов в сравниваемых группах ( $p = 0,276$ ).

Температурная реакция по Ме самая высокая (38,8°C) наблюдалась у больных ВИЧ-инфекцией и пневмониями в 3 группе, а наименьшая (37,5°C) в 4, у больных 1 и 2 группы температура тела по Ме составляла 38,6°C ( $N = 23,793$ ;  $p = 0,000$ ). Частота дыхательных движений в минуту составляла 20; 18,5; 22 и 20 в сравниваемых группах соответственно ( $N = 5,379$ ;  $p = 0,145$ ).

При аускультации легких везикулярное дыхание несколько чаще выслушивалось у пациентов 4 группы (8,2%), жестким дыхание было у подавляющего большинства больных в сравниваемых группах, при этом у трети пациентов дыхание было ослабленным, но с удлиненным

**Таблица 2. Стадии ВИЧ-инфекции в группах исследования, абс. (%)**

Table 2. HIV infection stages in groups of a research, abs. (%)

Стадия ВИЧ-инфекции HIV infection stages	1 группа 1 group (n = 70)	2 группа 2 group (n = 16)	3 группа 3 group (n = 65)	4 группа 4 group (n = 73)	$\chi^2/p$
2Б	1 (1,4%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	7,815/0,531
2В	8 (11,4%)	1 (6,3%)	3 (4,6%)	4 (5,5%)	2,888/0,41
3	16 (22,9)	8 (50,0%)	1 (1,5%)	13 (17,8%)	11,345/0,001
4А	20 (28,6%)	2 (12,5%)	19 (29,2%)	16 (21,9%)	7,815/0,433
4Б	15 (21,4%)	1 (6,3%)	17 (26,2%)	16 (21,9%)	7,815/0,41
4В	7 (10,0%)	4 (25,0%)	25 (38,5%)	13 (17,8%)	11,345/0,001
Не установлена Not determine	3 (4,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	11(15,1%)	15,55/0,002

выдохом ( $p = 0,05$ ). Сухие хрипы выслушивались чаще, чем влажные, однако у пациентов во 2 и 3 группах чаще выслушивалось сочетание и сухих, и влажных хрипов ( $p = 0,05$ ). При аускультации сердца у пациентов в 1 группе у 5,7% выслушивался систолический шум на верхушке ( $\chi^2 = 8,96$ ;  $p = 0,03$ ).

## Заключение

В соответствии с полученными данными, клинические и иммунологические проявления бактериальных пневмоний и ВИЧ-инфекции в зависимости от потребления инъекцион-

ных наркотиков различались незначительно. Наиболее высокая вирусная нагрузка отмечена у пациентов с ВИЧ-инфекцией и бактериальными пневмониями, заразившимися ВИЧ половым путем. Количество  $CD4^+$  лимфоцитов также было минимальным у пациентов с ВИЧ-инфекцией и пневмониями, никогда не потреблявших инъекционные наркотические препараты. Пациентами, заразившимися ВИЧ половым путем, с развившимися бактериальными пневмониями чаще устанавливались продвинутые стадии ВИЧ-инфекции, начиная со стадии IVA. Большая часть пациентов с ВИЧ-инфекцией и развившимися на этом фоне пнев-

**Таблица 3. Характеристика симптомов в группах исследования, абс. (%)**

Table 3. Characteristic of symptoms in groups of a research, abs. (%)

Признак Sign	1 группа 1 group (n = 70)	2 группа 2 group (n = 16)	3 группа 3 group (n = 65)	4 группа 4 group (n = 73)	$\chi^2/p$
Лихорадка Fever	61 (87,1%)	16 (100,0%)	58 (89,2%)	59 (80,8%)	4,984/0,173
Слабость, недомогание Weakness, malaise	60(85,7%)	13(81,3%)	61(93,8%)	62(84,9%)	7,815/0,307
Снижение аппетита Decreased appetite	36 (51,4%)	4 (25,0%)	35 (53,8%)	41 (56,2%)	20,291/0,01
Отсутствие аппетита Lack of appetite	9 (12,9%)	2 (12,5%)	14 (21,5%)	1 (1,4%)	
Боли в мышцах и суставах Muscle and joint pain	23 (32,9%)	0 (0,0%)	5 (7,7%)	2 (2,7%)	16,812/0,01
Кашель Cough	47 (67,1%)	11 (68,8%)	42 (64,6%)	48 (65,85)	0,152/0,985
сухой dry	22 (31,4%)	0 (0,0%)	27 (41,5%)	20 (27,4%)	15,771/< 0,05
влажный wet	25 (35,7%)	11 (68,8%)	15 (23,1%)	28 (38,4%)	
Одышка при нагрузке Dyspnea on exertion	25 (35,7%)	5 (31,3%)	31 (47,7%)	37 (50,7%)	6,294/> 0,05
Одышка в покое Dyspnea alone	10 (14,3%)	3 (18,8%)	10 (15,4%)	6 (8,2%)	
Боль в груди слева Left chest pain	31 (44,3%)	7 (43,8%)	26 (40,0%)	34 (46,6%)	6,229/> 0,05
справа on right	6 (8,6%)	1 (6,3%)	7 (10,8%)	8 (11,0%)	
без четкой локализации without clear localization	16 (22,9%)	2 (12,5%)	8 (12,3%)	9 (12,3%)	
Головная боль Headache	26 (37,1%)	2 (12,5%)	13 (20,0%)	11 (15,1%)	11,345/0,009
Головокружение Dizziness	7 (10,05)	0 (0,0%)	10 (15,4%)	11 (15,1%)	3,621/0,306
Тошнота Nausea	3 (4,3%)	2 (12,5%)	12 (18,5%)	9 (12,3%)	6,683/0,083
Рвота Vomiting	2 (2,9%)	4 (25,0%)	9 (13,8%)	3 (4,1%)	13,263/0,005
Боли в животе Stomach ache	1 (1,4%)	0 (0,0%)	5 (7,7%)	8 (11,0%)	6,837/0,078
Диарея Diarrhea	16 (22,9)	2 (12,5%)	11 (16,9%)	17 (23,3%)	3,871/0,276

**Таблица 4. Данные аускультации в группах исследования, абс. (%)**

Table 4. The given auscultation in groups of a research, abs. (%)

Признак Sign	1 группа 1 group (n = 70)	2 группа 2 group (n = 16)	3 группа 3 group (n = 65)	4 группа 4 group (n = 73)	$\chi^2/p$
<b>Аускультация легких/Auscultation of the lungs</b>					
<b>Везикулярное дыхание</b> Vesicular breathing	2 (2,9%)	0 (0,0%)	3 (4,6%)	6 (8,2%)	3,611/0,05
<b>Жесткое дыхание</b> Harsh breathing	41 (58,6%)	11 (68,8%)	39 (60,0%)	42 (57,5%)	
<b>Жесткое ослабленное дыхание</b> Harsh breathing, suppressed breath sounds	27 (38,6%)	5 (31,3%)	23 (35,4%)	25 (34,2%)	
<b>Сухие хрипы</b> Dry rales	25 (35,7%)	2 (12,5%)	14 (21,5%)	16 (21,9%)	6,306/0,09
<b>Влажные хрипы</b> Moist rales	10 (14,3%)	1 (6,3%)	3 (4,6%)	9 (12,3%)	4,097/0,252
<b>Сухие и влажные хрипы</b> Dry and moist rales	7 (10,0%)	3 (18,8%)	10 (15,4%)	2 (2,7%)	7,848/0,05
<b>Аускультация сердца/Auscultation of the heart</b>					
<b>Тоны сердца ясные</b> Clear heart tones	31 (44,3%)	11 (68,8%)	23 (35,4%)	39 (53,4%)	7,958/0,04
<b>Тоны сердца приглушены</b> Soft heart sounds	34 (48,6%)	5 (31,3%)	41 (63,1%)	34 (46,6%)	7,027/0,07
<b>Тоны сердца аритмичные</b> Arrhythmic heart sounds	1 (1,4%)	0 (0,0%)	1 (1,5%)	0 (0,0%)	1,335/0,7
<b>Систолический шум</b> Systolic noise	4 (5,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	8,96/0,03

мониями не получала АРТ, пациенты также отказывались от АРТ на фоне пневмонии, ложно убеждаясь в ее неэффективности.

Основной симптом пневмонии — лихорадка — могла отсутствовать у 10% пациентов с ВИЧ-инфекцией. При этом частыми проявлениями инфекций нижних дыхательных путей были кашель и боли в грудной клетке, одышка имела место у  $\frac{1}{3}$  больных. Боли в грудной клетке предполагали вовлечение плевры в воспалительный процесс. У каждого пятого больного в сравниваемых группах, несколько чаще у пациентов без факта потребления инъекционных наркотиков, отмечались нехарактерные для пневмонии симптомы, такие как головная боль, рвота, диарея, являющиеся предположительно следствием основного, далеко зашедшего заболевания.

Таким образом, на основании результатов проведенного исследования можно сделать за-

ключение о том, что лица, не потребляющие инъекционные наркотики, плохо осведомлены о риске заражения и путях передачи ВИЧ, не проходят обследование на ВИЧ до появления серьезных симптомов или развития заболеваний, заставляющих обратиться в учреждения ПМСП. В связи с этим требуется дополнительная информационная работа по привлечению к обследованию на ВИЧ лиц, имеющих риск получения вируса половым путем, считающих себя здоровыми. В плане совершенствования диагностики пневмоний врачам ПМСП следует обращать внимание на пациентов без лихорадки с симптомами со стороны нижних дыхательных путей, в обязательном порядке проводить им рентгенологическое исследование в приемном отделении, не отказывать в госпитализации, рано начинать антибактериальную терапию, что приведет к улучшению прогноза у таких пациентов.

## Список литературы/References

1. Гудинова Ж.В., Жернакова Г.Н., Толькова Е.И. Дружелюбная статистика: статистический анализ медицинских баз данных: пошаговые инструкции. Выпуск I. Омск: Изд-во ОмГМА, 2014. 112 с. [Gudinova Zh.V., Zhernakova G.N., Tolkova E.I. Friendly statistics: statistical analysis of medical databases: step-by-step instructions. Release I. Omsk: Publishing house of OMGMA, 2014. 112 p. (In Russ.)]
2. Донецкая Э.Г.-А. Клиническая микробиология: Руководство для специалистов клинической лабораторной диагностики. М.: ГЭОТАР-Медия, 2011. 480 с. [Donetskaya E.G.-A. Clinical microbiology: The management for experts of clinical laboratory diagnostics. Moscow: GEOTAR-Media, 2011. 480 p. (In Russ.)]

3. Зими́на В.Н., Астафьев А.В. Внебольничные пневмонии у взрослых больных ВИЧ-инфекцией: особенности течения и лечения, профилактика // Пульмонология. 2016. Т. 4, № 26. С. 488–497. [Zimina V.N., Astaf'ev A.V. Community-acquired pneumonia in adult HIV-infected patients: course, treatment, and prevention. *Pul'monologiya = Russian Pulmonology*, 2016, vol. 26, no. 4, pp. 488–497. doi: 10.18093/0869-0189-2016-26-4-488-497 (In Russ.)]
4. Chou S.H., Prabhu S.J., Crothers K., Stern E.J., Godwin J.D., Pipavath S.N. Thoracic diseases associated with HIV infection in the era of antiretroviral therapy: clinical and imaging findings. *Radiographics*, 2014, no. 4, pp. 895–911. doi: 10.1148/rg.344130115
5. Mitsch A.J., Hall H.I., Babu A.S. Trends in HIV infection among persons who inject drugs: United States and Puerto Rico, 2008–2013. *Am. J. Public Health*, 2016, vol. 106, no. 12, pp. 2194–2201. doi: 10.2105/AJPH.2016.30338
6. Neff C.P., Chain J.L., MaWhinney S., Martin A.K., Linderman D.J., Flores S.C., Campbell T.B., Palmer B.E., Fontenot A.P. Lymphocytic alveolitis is associated with the accumulation of functionally impaired HIV-specific T cells in the lung of antiretroviral therapy-naïve subjects. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2015, vol. 191, no. 4, pp. 464–473. doi: 10.1164/rccm.201408-1521OC
7. Sarkar P., Rasheed H.F. Clinical review: respiratory failure in HIV-infected patients — a changing picture. *Crit. Care*, 2013, vol. 17, no. 3: 228. doi: 10.1186/cc12552

---

**Авторы:**

**Пузырева Л.В.**, к.м.н., доцент кафедры фтизиатрии, фтизиохирургии и инфекционных болезней ФГБОУ ВО Омский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Омск, Россия;

**Мордык А.В.**, д.м.н., профессор, зав. кафедрой фтизиатрии, фтизиохирургии и инфекционных болезней ГБОУ ВПО Омский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Омск, Россия;

**Панева М.А.**, к.м.н., доцент кафедры госпитальной терапии и эндокринологии ГБОУ ВПО Омский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Омск, Россия.

**Authors:**

**Puzyreva L.V.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Phthisiology and Infectious Diseases, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation;

**Mordyk A.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Phthisiology and Infectious Diseases, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation;

**Paneva M.A.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Hospital Therapy and Endocrinology, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation.

---

Поступила в редакцию 11.06.2019  
Отправлена на доработку 15.01.2020  
Принята к печати 11.03.2020

---

Received 11.06.2019  
Revision received 15.01.2020  
Accepted 11.03.2020

# СРАВНИТЕЛЬНАЯ РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ АТОПИЧЕСКОЙ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ НА ПРИГРАНИЧНЫХ ТЕРРИТОРИЯХ ДВУХ ГОСУДАРСТВ — РОССИИ И ФИНЛЯНДИИ

О.А. Маркелова<sup>1</sup>, Н.Н. Везикова<sup>1</sup>, Э.К. Зильбер<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО Петрозаводский государственный университет, г. Петрозаводск, Россия

<sup>2</sup> ФГБУ Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Проведена оценка атопической сенсibilизации представителей двух групп населения, проживающих на смежных территориях России и Финляндии, идентичных по климато-географическим условиям. Установлена распространенность лиц с повышенным уровнем общего IgE, общего пищевого и общего ингаляционного IgE, исследован спектр атопической сенсibilизации к 8 ингаляционным (timoфеевка, береза, полынь, клещевидная травяная, лошадь, кошка, собака и клещ домашней пыли — *Dermatophagoides pteronyssinus*) и 6 пищевым (коровье молоко, куриное яйцо, тресковая рыба, соя, пшеница и арахис) аллергенам. Измерение выполнено с помощью радиоаллергосорбентного теста Phadiatop® для ингаляционных и пищевых аллергенов (UniCAP 1000 v.2; Pharmacia Upjohn, Uppsala, Швеция). Исследование проводилось в 2 этапа. На первом этапе, в 2003 г., обследованы случайно отобранные дети 7–15 лет из Финляндии (n = 344) и Республики Карелия (n = 427). На втором этапе, в 2010/2012 гг., обследовано 180 участников первого этапа: 98 финнов (38 мужского пола и 60 женского) и 82 представителя РФ (39 мужского пола и 43 женского). **Результаты.** Повышенный уровень IgE и в 2003 г., и 2010/2012 гг. чаще обнаруживался у представителей Финляндии; в динамике отмечалось незначительное снижение распространенности общего IgE в двух когортах. Повышенный уровень ингаляционного sIgE в 2003 г. и 2010/2012 гг. статистически достоверно чаще встречался у финнов (p = 0,019 и p = 0,027); в динамике установлен рост данной атопической сенсibilизации в двух исследуемых когортах. Повышенный пищевой sIgE в 2003 г. у финнов встречался чаще, чем у россиян (27,6% и 18,3%; p = 0,142). В 2010/2012 гг. распространенность пищевой сенсibilизации снизилась у финнов в 2 раза, у россиян — в 3 раза. В России в 2003 г. наиболее высокий уровень сенсibilизации выявлен к аллергенам клеща домашней пыли и кошки, далее следуют аллергены timoфеевки, березы и собаки. На 2 этапе отмечен рост сенсibilизации к аллергенам timoфеевки: увеличение практически в 2 раза до 12,2% (5,0; 19,4; p = 0,176); полыни: увеличение в 2 раза — до 7,3% (1,6; 13,1; p = 0,312); лошади: увеличение в 2 раза — до 2,4% (0,0; 5,8; p = 0,563); собаки: увеличение в 1,5 раза — до 7,3% (1,6; 13,1; p = 0,521); клеща домашней пыли: увеличение в 1,5 раза — до 22% (12,8; 31,1; p = 0,220). В Финляндии в 2003 г. преобладает сенсibilизация к аллергенам собаки — 26,5%, timoфеевки — 24,5%, березы — 20,4% и кошки — 20,4%. В 2010 г. отмечен рост сенсibilизации к ингаляционным аллергенам, преимущественно в отношении клеща домашней пыли — она увеличилась практически в 2 раза с 8,2 до 19,4% (p = 0,023) — и лошади — увеличилась более чем в 2 раза, с 5,1 до 13,3% (p = 0,047). Различия между исследуе-

## Адрес для переписки:

Маркелова Ольга Александровна  
185019, Россия, г. Петрозаводск, ул. Пирогова, 3,  
Республиканская больница имени В.А. Баранова.  
Тел.: 8 911 410-31-34.  
E-mail: olga-markelova2010@mail.ru

## Contacts:

Olga A. Markelova  
185019, Russian Federation, Petrozavodsk, Pirogova str., 3,  
V.A. Baranov Republican Hospital.  
Phone: +7 911 410-31-34.  
E-mail: olga-markelova2010@mail.ru

## Библиографическое описание:

Маркелова О.А., Везикова Н.Н., Зильбер Э.К. Сравнительная распространенность атопической сенсibilизации на приграничных территориях двух государств — России и Финляндии // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 4. С. 782–788. doi: 10.15789/2220-7619-COA-1221

## Citation:

Markelova O.A., Vezikova N.N., Zilber E.K. Comparative prevalence of atopic sensitization in the border areas between Russia and Finland // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 4, pp. 782–788. doi: 10.15789/2220-7619-COA-1221

мыми группами также выявлены при рассмотрении пищевого sIgE. В России в 2003 г. преобладает атопия к яичному белку, коровьему молоку и пшенице, в динамике наблюдения имеется тенденция к снижению ее уровня. В Финляндии наибольшая сенсibilизация выявлена к аллергенам коровьего молока, орехов, пшеницы и яичного белка, в динамике наблюдения также отмечено ее снижение. Сенсibilизации к аллергенам рыбы среди россиян и финнов не выявлено. Статистически достоверное различие в сенсibilизации между группами достигнуто только в отношении аллергенов арахиса и коровьего молока в 2003 г. На 2 этапе исследования имеет место снижение сенсibilизации к пищевым аллергенам, преимущественно у представителей Финляндии. Таким образом, различия в атопической сенсibilизации, развившиеся в детском возрасте, сохранялись между обследованными популяциями Финской и Российской Карелии и через 7–9 лет.

*Ключевые слова:* атопия, распространенность, динамика атопии, Россия, Финляндия, аллергические заболевания.

## COMPARATIVE PREVALENCE OF ATOPIC SENSITIZATION IN THE BORDER AREAS BETWEEN RUSSIA AND FINLAND

Markelova O.A.<sup>a</sup>, Vezikova N.N.<sup>a</sup>, Zilber E.K.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russian Federation

<sup>b</sup> St. Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** Current century has been highlighted with rise in allergic pathology, and environment markedly affects it via epigenetic mechanisms. Allergy research in Russia and Finland has been conducted for many years, of larger scale recorded in the latter, still being maintained over time. Atopy prevalence was studied in the border areas in both countries. The level of total, dietary, inhaled IgE level, as well as dietary and inhalation range were examined. The Phadiatop® radio allergen sorbent test was used (UniCAP 1000 v.2; Pharmacia Upjohn, Uppsala, Sweden), with cut-off point: IgE  $\geq$  110 kUA/l and sIgE  $\geq$  2.5 kUA/l and 0.35 kUA/l. The study was subdivided into 2 stages conducted during 2003 and 2010/2012 time-frame. Stage 1 was performed with children from Finland (n = 344), Russia (n = 427), aged 7–15 years, whereas stage 2 — 180 subjects (Finland, n = 98, Russia, n = 82). *Results.* It was found that total IgE level was higher in children from Finland. The inhaled sIgE in 2003 and 2010/2012 was higher among children from Finland, p = 0.019 and p = 0.027, showing temporal elevation. In 2003, dietary sIgE was higher among those from Finland (27.6% and 18.3%), p = 0.142, whereas in 2010/2012 it was decreased by 2- and 3-fold in subjects from Finland and Russia, respectively. In 2003, high atopy rate against dust mites, cats, timothy, birch, and dogs was found in Russia, which was increased at stage 2. Such parameter was most evidently elevated for timothy — by 2-fold, p = 0.176, wormwood — by 2-fold, p = 0.312, equine allergens — by 2-fold, p = 0.563, canine allergens — by 1.5-fold, mite — by 1.5-fold, p = 0.220. In 2003, atopy rate in Finland to canine allergens reached 26.5%, timothy — 24.5%, birch — 20.4%, feline allergens — 20.4%. In 2010, it was noted rise in atopy rate mainly to dust mites — by 2-fold, equine allergens — by 2-fold. In 2003, atopy rate in Russia to egg, milk, and wheat prevailed, whereas in Finland it was mostly found against milk, nuts, wheat, eggs, in both cases declined in dynamics. Interestingly, no sensitization to fish in subjects from Russia and Finland was observed at both stages. Finally, at the stage 2 dietary atopy rate was declined in both countries. Differences in atopic sensitization as well as during 7–9 year follow-up observation were preserved between both subject cohorts from Finland and Russia.

*Key words:* atopy, prevalence, time trend of atopy, Russia, Finland, allergic diseases.

## Введение

Сравнение распространенности атопической сенсibilизации у населения приграничных территориях двух разных государств вызывает определенный интерес. В качестве сравниваемых территорий были выбраны имеющие одинаковые климато-географические характеристики Республика Карелия (одна из республик, входящих в состав Северо-Западного федерального округа Российской Федерации) и сопредельный с ней регион Финляндии.

В Финляндии, как и в других западных странах, распространенность аллергических заболеваний растет [1, 2, 5]. В соседнем регионе, в российской Республике Карелия, аллергичес-

кие заболевания встречаются реже, как среди взрослых, так и среди детей [4, 6, 10]. В 2003 г. обследование школьников из северных районов Карелии и восточных районов Финляндии показало бóльшую распространенность в Финляндии повышенного уровня IgE и полученных при опросе с помощью анкеты ISSAC аллергических симптомов. В 2010/2012 гг. часть из этих детей была снова обследована [3].

Целью настоящего исследования стало изучение временных тенденций в этих двух контрастных когортах. Проанализировано и выполнено сравнение уровней общего (IgE) и специфических иммуноглобулинов E (sIgE), как объективных показателей атопической сенсibilизации [9].

## Материалы и методы

**Исследуемая когорта.** В 2003 г. в исследование случайным образом включены дети в возрасте 7–15 лет из Финляндии (n = 344) и из Республики Карелия (n = 427) [6, 10]. На этапе 2010/2012 гг. включены только те участники, которым выполнялось измерение IgE в 2003 г. — 180 человек: в 2010 г. — 98 финнов (38 мальчиков и 60 девочек), в 2012 г. — 82 россиянина (39 мальчиков и 43 девочки). Объем выборки уменьшился в виду негативного настроения (56 человек), переезда (290), неявки (78), отказа (74), большого объема обследования (93) [9].

Протокол исследования одобрен этическим комитетом Центральной больницы Хельсинкского университета, Петрозаводского государственного университета; от всех участников получено письменное информированное согласие.

Проанализированы уровни общего IgE и аллерген-специфических IgE между выборками и их временная динамика.

Собраны образцы сыворотки крови. Исследован уровень общего IgE, уровень sIgE к 8 ингаляционным аллергенам (тимофеевка, береза, полынь, кладоспория травяная, лошадь, кошка, собака и клещ домашней пыли — *Dermatophagoides pteronyssinus*) и 6 пищевым аллергенам (коровье молоко, куриное яйцо, тресковая рыба, соя, пшеница и арахис). Измерение выполнено с помощью радиоаллергосорбентного теста Phadiatop® для ингаляционных и пищевых аллергенов (UniCAP 1000 v.2; Pharmacia Upjohn, Uppsala, Швеция). Пороговые значения, используемые для определения положительных или отрицательных результатов concentra-

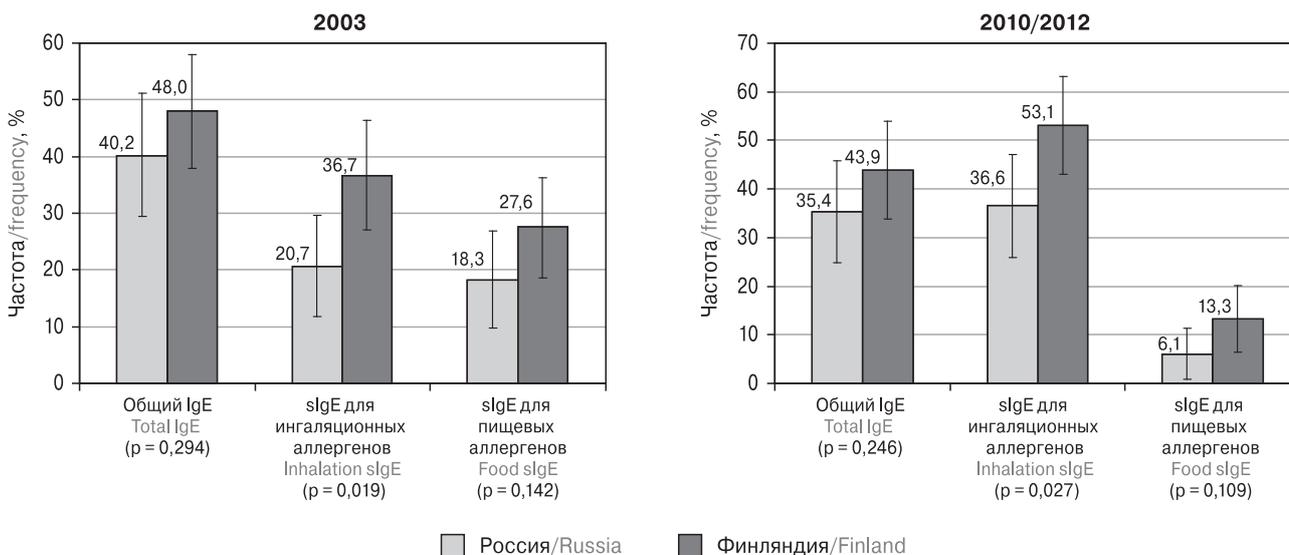
ции общего IgE  $\geq 110$  kUA/l и sIgE  $\geq 2,5$  kUa/l и 0,35 kUA/l.

**Статистические методы.** Рассчитаны соотношения и их 95% доверительный интервал (ДИ) с уровнем общего IgE  $\geq 110$  kUA/l и уровнем sIgE  $\geq 0,35$  kUA/l. Статистический анализ выполнен с помощью статистического пакета для программного обеспечения Stata, версия 11.0 (StataCorp., College Station, TX, США). Показатели обработаны с помощью статистического программного пакета R.

## Результаты

**Распространенность повышенного общего IgE, общего ингаляционного и пищевого sIgE (общий IgE  $\geq 110$  kUa/l, ингаляционный и пищевой sIgE  $\geq 2,5$  kUa/l, Phadiatop®).** У россиян в 2003 г. повышенный общий IgE выявлен в 40,2% (29,4; 51,1), в динамике наблюдения его уровень изменился незначительно — 35,4% (24,8; 45,9; p = 0,526). Повышенный ингаляционный sIgE в 2003 г. составил 20,7% (11,8; 29,7), в 2012 г. его распространенность статистически достоверно возросла до 36,6% (25,9; 47,2; p = 0,024). Распространенность повышенного пищевого sIgE в 2003 г. составила 18,3% (9,7; 26,8), на 2 этапе — статистически достоверно снизилась до 6,1% (0,8; 11,4; p = 0,017).

У финнов распространенность повышенного общего IgE в 2003 г. составила 48% (37,9; 58,0), в динамике наблюдения она изменилась незначительно, 43,9% (33,9; 53,9; p = 0,565). Повышенный ингаляционный sIgE в 2003 г. составляет 36,7% (27,0; 46,4), в динамике растет практически в 1,5 раза до 53,1% (43,0; 63,1;



**Рисунок 1. Сравнительная эпидемиология атопической сенсibilизации (общий IgE  $\geq 110$  kUa/l, ингаляционный и пищевой sIgE  $\geq 2,5$  kUa/l, Phadiatop®) 2003, 2010/2012 гг.**

Figure 1. Comparative epidemiology of atopic sensitization (total IgE  $\geq 110$  kUa/l, inhalation and food sIgE  $\geq 2.5$  kUa/l, Phadiatop®) 2003, 2010/2012

$p = 0,021$ ). Повышенный пищевой sIgE в 2003 г. встречается в 27,6% (18,5; 36,6), в 2010 г. — в 2 раза реже и составляет 13,3% (6,4; 20,1;  $p = 0,013$ ).

*Сравнительная эпидемиология атопической сенсibilизации (общий IgE  $\geq 110$  kUa/l, ингаляционный и пищевой sIgE  $\geq 2,5$  kUa/l, Phadiatop®).* На территории Финляндии распространенность повышенного общего IgE в 2003 г. и 2010/2012 гг. выявлялась чаще, но различия не имеют статистической достоверности (2003 г.  $p = 0,294$ ; 2010/2012 гг.  $p = 0,246$ , рис. 1). В динамике имеется тенденция к незначительному снижению распространенности общего IgE в двух когортах.

Статистически достоверно более высокий уровень ингаляционного sIgE в 2003 и 2010/2012 гг. отмечен на финской стороне ( $p = 0,019$ ; в 2003 г. и  $p = 0,027$  в 2010/2012 гг.). В динамике наблюдения имел место рост атопической сенсibilизации к общему ингаляционному аллергену в двух исследуемых когортах.

Повышенный пищевой sIgE в 2003 г. на финской стороне встречался чаще (27,6 и 18,3%), но различия между группами были статистически не достоверны ( $p = 0,142$ ). В 2010/2012 гг. распространенность пищевой сенсibilизации снижается у финнов в 2 раза, у россиян в 3 раза (различия статистически не достоверны,  $p = 0,109$ ).

**Таблица 1. Распространенность повышенного sIgE к 8 ингаляционным аллергенам в России ( $\geq 0,35$  kUA/l, Phadiatop®)**

Table 1. The prevalence of elevated sIgE to 8 inhaled allergens in Russia ( $\geq 0.35$  kUA/l, Phadiatop®)

Аллерген Allergen	Частота (95%ДИ) Frequency (95%CI)		
	2003 г. n = 82	2012 г. n = 81	P
Тимофеевка Timothy grass	6,1 (0,8; 11,4)	12,2 (5,0; 19,4)	0,176
Береза Birch	6,1 (0,8; 11,4)	7,3 (1,6; 13,1)	0,759
Полынь Mugwort	3,7 (0,0; 7,8)	7,3 (1,6; 13,1)	0,312
Травяная кладоспория Cladosporium herbarum	1,2 (0,0; 3,6)	0,0	0,324
Лошадь Horse	1,2 (0,0; 3,6)	2,4 (0,0; 5,8)	0,563
Кошка Cat	7,3 (1,6; 13,1)	7,3 (1,6; 13,1)	1,0
Собака Dog	4,9 (0,1; 9,6)	7,3 (1,6; 13,1)	0,521
Клещ домашней пыли House dust mite	14,6 (6,8; 22,4)	22,0 (12,8; 31,1)	0,220

Таким образом, атопическая сенсibilизация чаще встречается в Финляндии, чем в России. В динамике наблюдения отмечаются схожие тенденции на территории двух приграничных государств: незначительный рост общего IgE, увеличение sIgE к ингаляционным аллергенам и снижение sIgE к пищевым аллергенам.

*Распространенность повышенного sIgE к 8 ингаляционным аллергенам ( $\geq 0,35$  kUA/l, Phadiatop®).* На территории России в 2003 г. наиболее высокий уровень сенсibilизации выявлен к аллергенам клеща домашней пыли и кошки, далее следуют аллергены тимофеевки, березы и собаки (табл. 1).

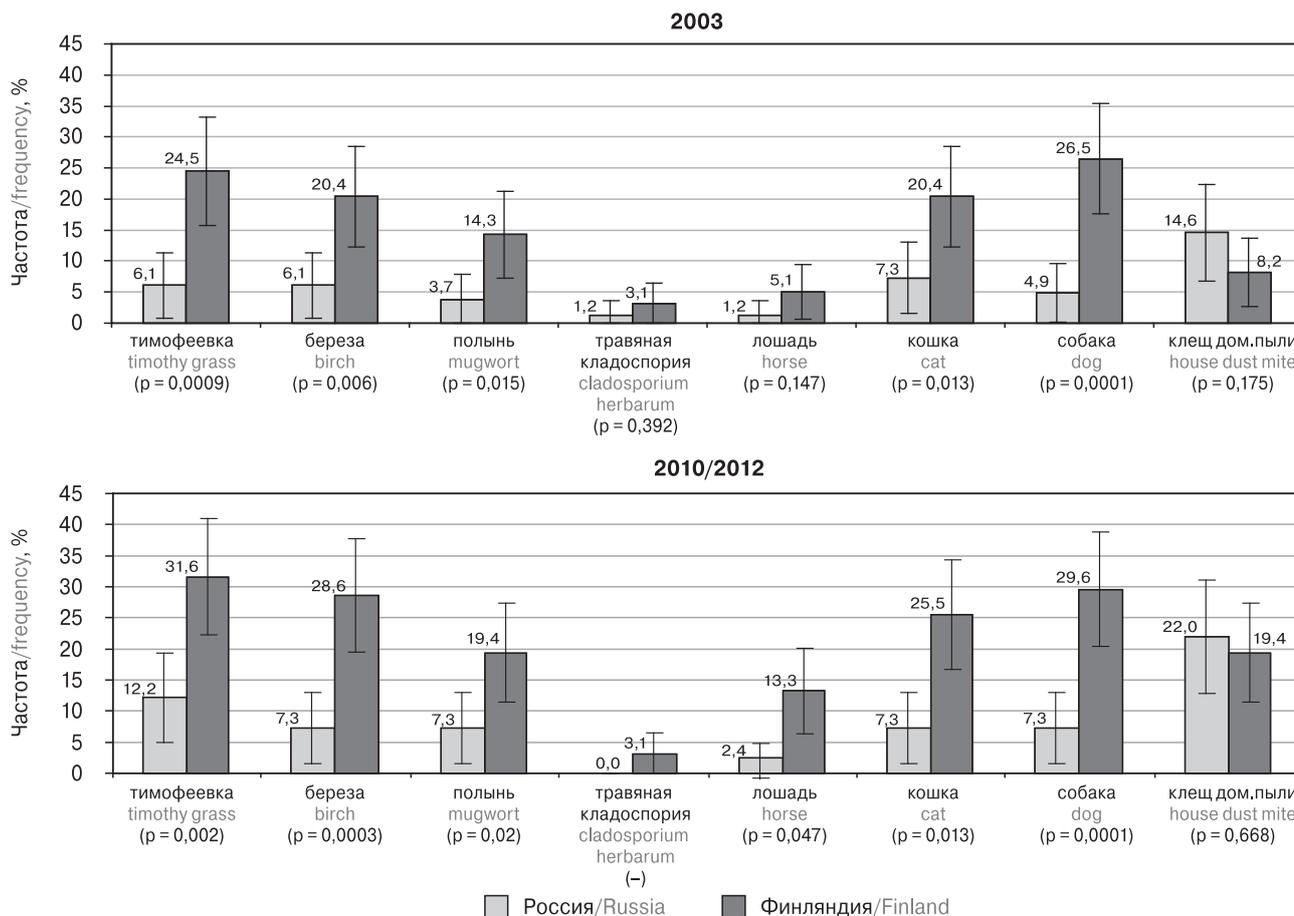
В динамике наблюдения отмечается нарастание распространенности сенсibilизации. Наиболее сильно это прослеживается в отношении аллергенов тимофеевки — выявлен рост сенсibilизации практически в 2 раза — до 12,2% (5,0; 19,4;  $p = 0,176$ ), полыни в 2 раза — до 7,3% (1,6; 13,1;  $p = 0,312$ ), лошади в 2 раза — до 2,4% (0,0; 5,8;  $p = 0,563$ ), собаки в 1,5 раза — до 7,3% (1,6; 13,1;  $p = 0,521$ ), клеща домашней пыли в 1,5 раза — до 22% (12,8; 31,1;  $p = 0,220$ ).

Атопическая сенсibilизация на территории Финляндии в 2003 г. характеризуется преобладанием сенсibilизации к аллергенам собаки — 26,5%, тимофеевки — 24,5%, березы — 20,4% и кошки — 20,4% (табл. 2)

**Таблица 2. Распространенность повышенного sIgE к 8 ингаляционным аллергенам в Финляндии ( $\geq 0,35$  kUA/l, Phadiatop®)**

Table 2. Prevalence of elevated sIgE to 8 inhaled allergens in Finland ( $\geq 0.35$  kUA/l, Phadiatop®)

Аллерген Allergen	Частота (95%ДИ) Frequency (95%CI)		
	2003 г. n = 98	2010 г. n = 98	P
Тимофеевка Timothy grass	24,5 (15,8; 33,2)	31,6 (22,3; 41,0)	0,269
Береза Birch	20,4 (12,3; 28,5)	28,6 (19,5; 37,7)	0,182
Полынь Mugwort	14,3 (7,2; 21,3)	19,4 (11,4; 27,4)	0,340
Травяная кладоспория Cladosporium herbarum	3,1 (0,0; 6,5)	3,1 (0,0; 6,5)	1,0
Лошадь Horse	5,1 (0,7; 9,5)	13,3 (6,4; 20,1)	0,047
Кошка Cat	20,4 (12,3; 28,5)	25,5 (16,7; 34,3)	0,396
Собака Dog	26,5 (17,6; 35,4)	29,6 (20,4; 38,8)	0,629
Клещ домашней пыли House dust mite	8,2 (2,6; 13,7)	19,4 (11,4; 27,4)	0,023



**Рисунок 2. Сравнительная распространенность атопии к 8 ингаляционным аллергенам в Финляндии и России, 2003 и 2010/2012 гг. ( $\geq 0,35$  kUA/l, Phadiatop®)**

Figure 2. Comparative prevalence of atopy for 8 inhaled allergens in Finland and Russia, 2003 and 2010/2012 ( $\geq 0.35$  kUA/l, Phadiatop®)

В 2010 г. отмечается нарастание сенсибилизации к ингаляционным аллергенам. Это наиболее выражено в отношении аллергенов клеща домашней пыли, распространенность сенсибилизированных лиц к которым увеличивается практически в 2 раза: с 8,2 до 19,4% ( $p = 0,023$ ), и аллергенов лошади, распространенность сенсибилизации к которым увеличивается более чем в 2 раза: с 5,1 до 13,3% ( $p = 0,047$ ).

Сравнительная распространенность атопии к 8 ингаляционным аллергенам в Финляндии и России в 2003 и 2010/2012 гг. ( $\geq 0,35$  kUA/l, Phadiatop®). Профили sIgE существенно различались между двумя исследуемыми группами (рис. 2). За исследуемый период уровень sIgE ингаляционных аллергенов у финнов увеличился в сравнении с россиянами. Исключением стал уровень sIgE к аллергенам клеща домашней пыли, который у россиян на обоих этапах исследования был больше.

При рассмотрении пищевого sIgE различия между исследуемыми группами тоже выявлены, но количество положительных случаев меньше, чем в случае ингаляционных аллергенов.

Распространенность сенсибилизации к 6 пищевым аллергенам ( $\geq 0,35$  kUA/l, Phadiatop®). Распространенность сенсибилизации к пищевым аллергенам в российской выборке представлена в таблице 3.

В 2003 г. наибольшая сенсибилизация выявлена к яичному белку, коровьему молоку и пшенице, в динамике наблюдения отмечена тенденция к снижению пищевой сенсибилизации.

Распространенность повышенного уровня sIgE в финской выборке представлена в таблице 4.

Наибольшая сенсибилизация выявлена к коровьему молоку, орехам, пшенице и яичному белку, в динамике наблюдения среди исследуемых лиц обнаружено закономерное снижение распространенности атопической пищевой сенсибилизации.

Интересно, что на обоих этапах исследования не выявлена сенсибилизация к аллергенам рыбы, как среди россиян, так и среди финнов.

Сравнительная распространенность пищевой сенсибилизации в Финляндии и России в 2003 и 2010/2012 гг. (sIgE  $\geq 0,35$  kUA/l, Phadiatop®). Статистически достоверное различие между

**Таблица 3. Распространенность сенсibilизации к 6 пищевым аллергенам в России ( $\geq 0,35$  kUA/l, Phadiatop®)**

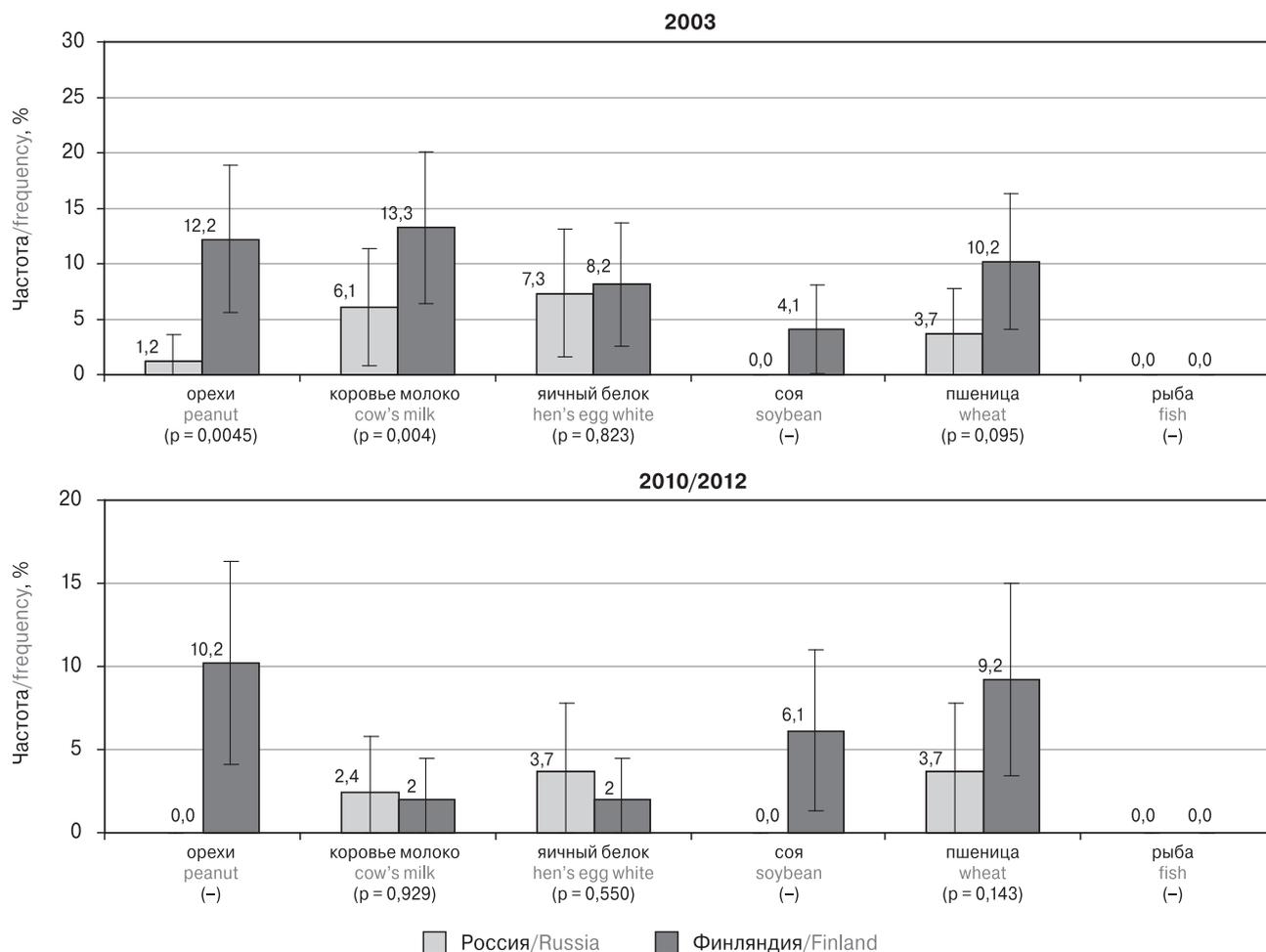
Table 3. The prevalence of sensitization to 6 food allergens in Russia ( $\geq 0.35$  kUA/l, Phadiatop®)

Аллерген Allergen	Россия/частота (95%ДИ) Russia/frequency (95%CI)		
	2003 г. n = 82	2012 г. n = 81	P
Орех Peanut	1,2 (0,0; 3,6)	0,0	–
Коровье молоко Cow's milk	6,1 (0,8; 11,4)	2,4 (0,0; 5,8)	0,242
Яичный белок Hen's egg white	7,3 (1,6; 13,1)	3,7 (0,0; 7,8)	0,313
Соя Soybean	0,0	0,0	–
Пшеница Wheat	3,7 (0,0; 7,8)	3,7 (0,0; 7,8)	1,0
Рыба Fish	0,0	0,0	–

**Таблица 4. Распространенность сенсibilизации к 6 пищевым аллергенам в Финляндии ( $\geq 0,35$  kUA/l, Phadiatop®)**

Table 4. Prevalence of sensitization to 6 food allergens in Finland ( $\geq 0.35$  kUA/l, Phadiatop®)

Аллерген Allergen	Финляндия/частота (95%ДИ) Finland/frequency (95%CI)		
	2003 г. n = 98	2010 г. n = 98	P
Орехи Peanut	12,2 (5,6; 18,9)	10,2 (4,1; 16,3)	0,658
Коровье молоко Cow's milk	13,3 (6,4; 20,1)	2,0 (0,0; 4,9)	0,003
Яичный белок Hen's egg white	8,2 (2,6; 13,7)	2,0 (0,0; 4,9)	0,049
Соя Soybean	4,1 (0,1; 8,1)	6,1 (1,3; 11,0)	0,526
Пшеница Wheat	10,2 (4,1; 16,3)	9,2 (3,4; 15,0)	0,814
Рыба Fish	0,0	0,0	–



**Рисунок 3. Сравнительная распространенность пищевой сенсibilизации в Финляндии и России в 2003 и 2010/2012 гг. (slgE  $\geq 0,35$  kUA/l, Phadiatop®)**

Figure 3. Comparative prevalence of food sensitization in Finland and Russia in 2003 and 2010/2012 (slgE  $\geq 0.35$  kUA/l, Phadiatop®)

группами достигнуто только в отношении сенсibilизации к аллергенам арахиса и коровьего молока в 2003 г., в остальных случаях различия между группами были статистически не достоверны. В динамике наблюдения через 7–9 лет отмечено снижение сенсibilизации к пищевым аллергенам, преимущественно на финской стороне, но аналогичная тенденция установлена и среди россиян (рис. 3).

## Вывод

В течение 10-летнего периода наблюдения за двумя исследуемыми когортами, проживающими на территориях, совпадающих по кли-

мато-географическим условиям, но различных по социоэкономическому фактору (уровень урбанизации, особенности питания, физическая активность, образ жизни), а именно в Финляндии и Республике Карелия (РФ), сохраняется разная распространенность атопической сенсibilизации. Результаты исследования подтверждают уже имеющиеся выводы о том, что влияние естественной природной окружающей среды в раннем периоде жизни играет решающую роль в развитии аллергических проявлений в более позднем возрасте [7, 8, 11]. Изменения влияния факторов окружающей среды во взрослом возрасте не приводят к увеличению атопической сенсibilизации.

## Список литературы/References

1. Asher M.I., Montefort S., Björkstén B., Lai C.K., Strachan D.P., Weiland S.K., Williams H., ISAAC Phase Three Study Group. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC phases one and three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet*, 2006, vol. 368, pp. 733–743. doi: 10.1016/s0140-6736(06)69283-0
2. Genuneit J., Seibold A.M., Apfelbacher C.J., Konstantinou G.N., Koplin J.J., La Grutta S., Logan K., Perkin M.R., Flohr C. Overview of systematic reviews in allergy epidemiology. *Allergy*, 2017, vol. 72, iss. 6. doi:10.1111/all.13123
3. Haahtela T., Laatikainen T., Alenius H., Auvinen P., Fyhrquist N., Hanski I., Herten L., Jousilahti P., Kosunen T., Markelova O., Mäkelä M., Pantelejev V., Uhanov M., Zilber E., Vartiainen E. Hunt for the origin of allergy — comparing the Finnish and Russian Karelia. *J. Clin. Exp. All.*, 2015, vol. 45, pp. 891–901. doi: 10.1111/cea.12527
4. Laatikainen T., von Hertzen L., Koskinen J.P., Mäkelä M.J., Jousilahti P., Kosunen T.U., Vlasoff T., Ahlström M., Vartiainen E., Haahtela T. Allergy gap between Finnish and Russian Karelia on increase. *Allergy*, 2011, vol. 66, pp. 886–892. doi: 10.1111/j.1398-9995.2010.02533.x
5. Pawankar R., Canonica G.W., Holgate S., Lockey R.F. WAO White Book on Allergy 2011–2012: Executive Summary. *World Allergy Organization (WAO)*, 2011. doi: 10.1163/1570-6664\_iyb\_sim\_org\_38984
6. Pekkarinen P.T., von Hertzen L., Laatikainen T., Mäkelä M.J., Jousilahti P., Kosunen T.U., Pantelejev V., Vartiainen E., Haahtela T. A disparity in the association of asthma, rhinitis, and eczema with allergen-specific IgE between Finnish and Russian Karelia. *Allergy*, 2007, vol. 62, pp. 281–287. doi: 10.1111/j.1398-9995.2006.01249.x
7. Prescott S.L. Early-life environmental determinants of allergic diseases and the wider pandemic of inflammatory noncommunicable diseases. *J. All. Clin. Imm.*, 2013, vol. 131, pp. 23–30. doi: 10.1016/j.jaci.2012.11.019
8. Riedler J., Braun-Fahrlander C., Eder W., Schreuer M., Waser M., Maisch S., Carr D., Schierl R., Nowak D., von Mutius E. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet*, 2001, vol. 358, pp. 1129–1133. doi: 10.1016/s0140-6736(01)06252-3
9. Ruokolainen L., Paalanen L., Karkman A., Laatikainen T., von Hertzen L., Vlasoff T., Markelova O., Masyuk V., Auvinen P., Paulin L., Alenius H., Fyhrquist N., Hanski I., Mäkelä M.J., Zilber E., Jousilahti P., Vartiainen E., Haahtela T. Epidemiology of allergic disease. Significant disparities in allergy prevalence and microbiota between the young people in Finnish and Russian Karelia. *J. Clin. Exp. All.*, 2017, vol. 47, iss. 5, pp. 665–674. doi: 10.1111/cea.12895
10. Von Hertzen L., Mäkelä M.J., Petäys T., Jousilahti P., Kosunen T.U., Laatikainen T., Vartiainen E., Haahtela T. Growing disparities in atopy between the Finns and the Russians: a comparison of 2 generations. *J. Allergy Clin. Imm.*, 2006, vol. 117, pp. 151–157. doi: 10.1016/j.jaci.2005.07.028
11. Von Mutius E., Vercelli D. Farm living: effects on childhood asthma and allergy. *Nat. Rev. Immunol.*, 2010, vol. 10, pp. 861–868. doi: 10.1038/nri2871

### Авторы:

**Маркелова О.А.**, врач-пульмонолог ГБУЗ Республиканская больница имени В.А. Баранова, г. Петрозаводск, Россия; сотрудник кафедры Госпитальной терапии курса последипломного образования по пульмонологии Медицинского института Петрозаводского государственного университета, г. Петрозаводск, Россия;  
**Везикова Н.Н.**, д.м.н., профессор, зав. кафедрой госпитальной терапии Медицинского института Петрозаводского государственного университета, главный внештатный терапевт Минздрава Республики Карелия, г. Петрозаводск, Россия;  
**Зильбер Э.К.**, д.м.н., ведущий научный сотрудник ФГБУ Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

### Authors:

**Markelova O.A.**, Pulmonologist, V.A. Baranov Republican Hospital, Petrozavodsk, Russian Federation; Employee of the Department of Hospital Therapy, Postgraduate Education in Pulmonology, Medical Institute of Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russian Federation;  
**Vezikova N.N.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Hospital Therapy, Medical Institute of Petrozavodsk State University, Chief Therapist of the Ministry of Health of the Republic of Karelia, Petrozavodsk, Russian Federation;  
**Zilber E.K.**, PhD, MD (Medicine), Leading Researcher, St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 11.06.2019  
 Отправлена на доработку 20.11.2019  
 Принята к печати 11.03.2020

Received 11.06.2019  
 Revision received 20.11.2019  
 Accepted 11.03.2020

# PARTHENOLIDE: SUGGESTED DRUG FOR COVID-19

M. Nemati, F. Danesh Pouya, E. Roshni Asl, Y. Rasmi

Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

**Abstract.** Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) that causes acute respiratory distress syndrome (ARDS) which is the main reason for patients mortality. One of the effective treatments to reduce the effects of this virus is parthenolide (PN). Parthenolide is a sesquiterpene lactone found in medicinal plants. It can inhibit several pro-inflammatory signaling pathways, in particular the ATPase activity of NLRP3. Based on its ability to suppress inflammatory signal transduction and elevated level of serum IL-1 $\beta$  (a surrogate marker for NLRP3 activation) in COVID-19 patients, we suggest that PN could be potentially effective for the treatment of COVID-19.

**Key words:** Parthenolide, COVID-19, NF- $\kappa$ B.

## ПАРТЕНОЛИД: ВОЗМОЖНОЕ ЛЕКАРСТВО ОТ COVID-19

Немати М., Данеш Пойа Ф., Рохни Асл Е., Расми Ю.

Урмийский университет медицинских наук, Урмия, Иран

**Резюме.** Новый коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2) вызывает развитие респираторного дистресс-синдрома, являющегося основной причиной смерти пациентов. Одним из эффективных методов снижения воздействия этого вируса является партенолид (PN). Партенолид — сесквитерпеновый лактон, содержащийся в лекарственных растениях, способный подавлять ряд провоспалительных сигнальных каскадов, в частности АТФ-азную активность инфламмосомы NLRP3. Учитывая его способность блокировать проведение воспалительных сигналов и повышенный уровень сывороточного цитокина IL-1 $\beta$  (как суррогатного маркера активации NLRP3) у пациентов с COVID-19, мы полагаем, что Партенолид мог бы быть эффективен при лечении COVID-19.

**Ключевые слова:** Партенолид, COVID-19, NF- $\kappa$ B.

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), or the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV), is rapidly spreading from Wuhan, Hubei Province, China, to the rest of the world [11]. Respiratory failure from acute respiratory distress syndrome (ARDS) is the prominent reason for mortality [9]; so, there is a critical need for effective treatment. The P21-activated kinase (PAK1, RAC/CDC42-activated kinase 1) is the main “pathogenic” kinase. The abnormal activation of PAK1 takes place due to different diseases/disorders such as inflamma-

tion, malaria, and pandemic viral infection such as influenza and COVID-19 [8]. In the PAK1 signaling pathway, after activation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) by epidermal growth factor (EGF), then RAS (guanosine-nucleotide-binding protein) activates; following that, PAK1 stimulates inflammatory pathways by nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) activation [4]. The NF- $\kappa$ B controls the expression of genes encoding the chemokines (e.g., IL-8), pro-inflammatory cytokines (e.g., IL-1, IL-2, IL-6 and TNF $\alpha$ ), inducible enzymes (e.g., cyclooxy-

---

### Адрес для переписки:

Юсеф Расми  
Иран, Урмия, Урмийский университет медицинских наук.  
Тел.: +989143174740. Факс: +984432780801.  
E-mail: rasmiy@umsu.ac.ir

### Contacts:

Yousef Rasmi  
Iran, Urmia, Urmia University of Medical Sciences.  
Phone: +989143174740. Fax: +984432780801.  
E-mail: rasmiy@umsu.ac.ir

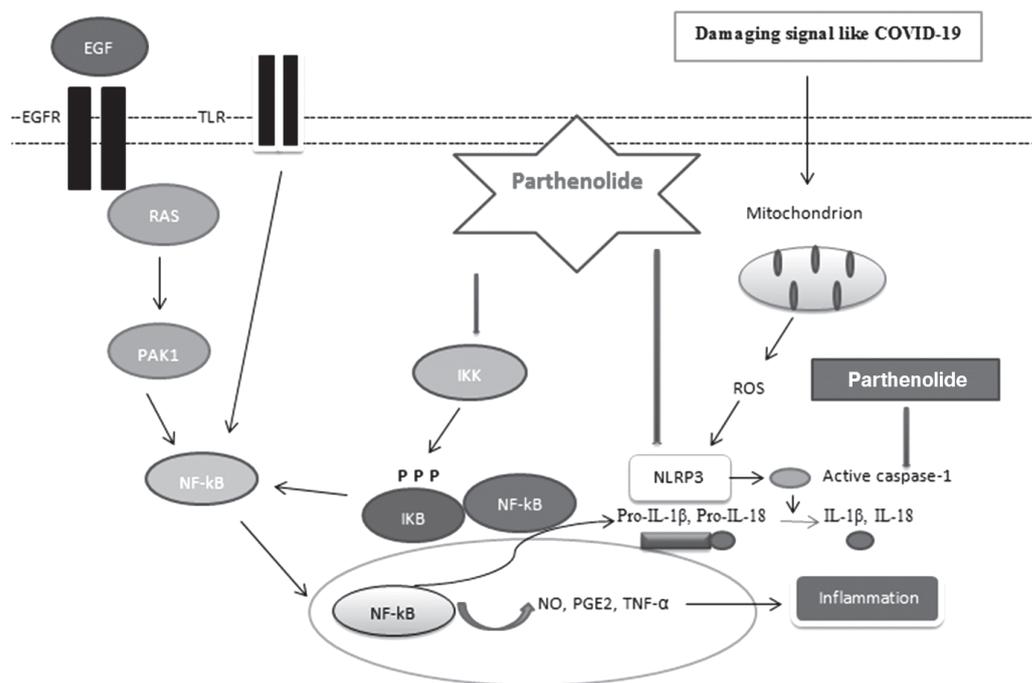
---

### Библиографическое описание:

Немати М., Данеш Пойа Ф., Рохни Асл Е., Расми Ю. Партенолид: возможное лекарство от COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 4. С. 789–791. doi: 10.15789/2220-7619-PSD-1509

### Citation:

Nemati M., Danesh Pouya F., Roshni Asl E., Rasmi Y. Parthenolide: suggested drug for COVID-19 // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 4, pp. 789–791. doi: 10.15789/2220-7619-PSD-1509



**Figure. Anti-inflammatory effect of Parthenolide on COVID-19**

EGF — Epidermal growth factor; EGFR — Epidermal growth factor receptor; PAK1 — P21 activated kinase 1; NF- $\kappa$ B — Nuclear factor kappa B; NO — Nitric oxide; PGE2 — Prostaglandin E2; TNF $\alpha$  — Tumor necrosis factor-alpha; IL-1 $\beta$  — Interleukin-1 $\beta$ ; IL-18 — Interleukin-18; TLR — Toll-like receptor; ROS — Reactive oxygen species; IKK — I $\kappa$ B kinase; I $\kappa$ B — inhibitory protein of NF- $\kappa$ B complex; NLRP3 — NLR family pyrin domain containing 3.

genase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS)), adhesion molecules (e.g., intracellular adhesion molecule (ICAM) and E-selectin), growth factors, some of the acute phase proteins, and immune receptors, all of these factors play critical roles in controlling most inflammatory process [1]. One of the effective treatments to reduce the effects of this signaling pathway is parthenolide (PN). Parthenolide is a sesquiterpene lactone found in medicinal plants, particularly in feverfew (*Tanacetum parthenium*) [10]. Parthenolide has anti-inflammatory actions through the inhibition of several pro-inflammatory signaling pathways, including nitric oxide (NO), prostaglandins (PGs), leukotrienes (LTs), TNF $\alpha$ , and cytokines of the IL families [1]. Studies have shown that PN is capable of inhibiting the activity of the NF- $\kappa$ B subunit RelA/p65 by inhibiting the I $\kappa$ B (inhibitory protein of NF- $\kappa$ B complex) kinase-mediated phosphorylation of I $\kappa$ B [3], suggesting that PN is a novel therapeutic agent for treating COVID-19. Parthenolide also inhibits the activity of multiple

inflammasomes, which produces the active pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18 from the inactive pro-IL-1 $\beta$  and pro-IL-18, in macrophages by directly inhibiting the protease activity of caspase-1 [6]. The NLR family pyrin domain containing 3 (NALP3) inflammasome [4] is an important component of the innate immune response against a broad range of microbial signals and it is activated by diverse signals such as viruses [7]. The molecular mechanism of activation of the NLRP3 inflammasome by these diverse stimuli is still unclear, but the evidence suggests that NLRP3 is transcriptionally up-regulated by NF- $\kappa$ B-inducing stimuli such as ligands of the Toll-like receptors [2]. Juliana et al. have shown for the first time that PN is an inhibitor of the ATPase activity of NLRP3 [6]. On the other hand, the investigations reported that serum IL-1 $\beta$  (a surrogate marker for NLRP3 activation) elevates in COVID-19 patients [5]. Therefore, we can suggest that PN, an anti-inflammatory agent that inhibits the NF- $\kappa$ B, NLRP3, and caspase 1, is the potentially effective treatment for COVID-19 (fig.).

## References

1. Abad M.J., Guerra J.A., Bermejo P., Govil J., Singh V.K., Mishra S.K. Phytochemistry and pharmacology of *Tanacetum*: recent developments (2008).
2. Bauernfeind F.G., Horvath G., Stutz A., Alnemri E.S., MacDonald K., Speert D., Fernandes-Alnemri T., Wu J., Monks B.G., Fitzgerald K.A., Hornung V., Latz E. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J. Immunol.*, 2009, vol. 183, no. 2, pp. 787–791. doi: 10.4049/jimmunol.0901363

3. Dai Y., Guzman M.L., Chen S., Wang L., Yeung S.K., Pei X.Y., Dent P., Jordan C.T., Grant S. The NF (Nuclear factor)- $\kappa$ B inhibitor parthenolide interacts with histone deacetylase inhibitors to induce MKK7/JNK1-dependent apoptosis in human acute myeloid leukaemia cells. *Br. J. Haematol.*, 2010, vol. 151, no. 1, pp. 70–83. doi: 10.1111/j.1365-2141.2010.08319.x
4. Dammann K., Khare V., Gasche C. Tracing PAKs from GI inflammation to cancer. *Gut*, 2014, vol. 63, no. 7, pp. 1173–1184. doi: 10.1136/gutjnl-2014-306768
5. Fitzgerald K.N. A few additional treatment possibilities for COVID19 (SARS Cov-2) addressing furin-like cleavage and pyroptosis (caspase-1 activation of inflammasome NLRP3). URL: <https://www.drkarafitzgerald.com/2020/03/25/a-few-additional-treatment-possibilities-in-covid19-sars-cov-2-addressing-furin-like-cleavage-and-pyroptosis-caspacin-1-activation-of-inflammasome-nlrp3> (10.09.2020)
6. Juliana C., Fernandes-Alnemri T., Wu J., Datta P., Solorzano L., Yu J.W., Meng R., Quong A.A., Latz E., Scott C.P., Alnemri E.S. Anti-inflammatory compounds parthenolide and Bay 11-7082 are direct inhibitors of the inflammasome. *J. Biol. Chem.*, 2010, vol. 285, no. 13, pp. 9792–9802. doi: 10.1074/jbc.M109.082305
7. Martinon F., Mayor A., Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu. Rev. Immunol.*, 2009, vol. 27, pp. 229–265.
8. Maruta H., He H. A mini-review for COVID-19 issue (2020). URL: <http://apitherapy.com/wp-content/uploads/2020/06/Propolis-melatonin-artemisinin-and-other-substances-as-PAK1-blocking-Therapy-of-Pandemic-Coronaviral-Infection-2020-Australia.pdf> (20.08.2020)
9. Ruan Q., Yang K., Wang W., Jiang L., Song J. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care Med.*, 2020, vol. 46, no. 5, pp. 846–848. doi: 10.1007/s00134-020-05991-x
10. Smolinski A.T., Pestka J.J. Comparative effects of the herbal constituent parthenolide (Feverfew) on lipopolysaccharide-induced inflammatory gene expression in murine spleen and liver. *J. Inflamm.*, 2005, no. 2: 6. doi: 10.1186/1476-9255-2-6
11. Wang C., Horby P.W., Hayden F.G., Gao G.F. A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet*, 2020, vol. 395, no. 10223, pp. 470–473. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30185-9

**Авторы:**

**Немати М.**, кафедра биохимии медицинского факультета Урмийского университета медицинских наук, Урмия, Иран;  
**Данеш Пойа Ф.**, кафедра биохимии медицинского факультета Урмийского университета медицинских наук, Урмия, Иран;  
**Рохни Асл Е.**, кафедра биохимии медицинского факультета Урмийского университета медицинских наук, Урмия, Иран;  
**Расми Ю.**, кафедра биохимии медицинского факультета Урмийского университета медицинских наук, Урмия, Иран; Центр клеточных и молекулярных исследований, Университет медицинских наук Урмия, Урмия, Иран.

**Authors:**

**Nemati M.**, Department of Biochemistry, School of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran;  
**Danesh Pouya F.**, Department of Biochemistry, School of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran;  
**Roshni Asl E.**, Department of Biochemistry, School of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran;  
**Rasmi Y.**, Department of Biochemistry, School of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran; Cellular and Molecular Research Center, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran.

Поступила в редакцию 15.06.2020  
Принята к печати 04.07.2020

Received 15.06.2020  
Accepted 04.07.2020

# УСКОРЕННЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ «СВОЙ–ЧУЖОЙ» МИКРООРГАНИЗМОВ В РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ

О.В. Бухарин, Н.Б. Перунова, И.Н. Чайникова, Е.В. Иванова, С.В. Андриященко

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, ФГБУН Оренбургский федеральный исследовательский центр УрО РАН, г. Оренбург, Россия

**Резюме.** Предложен простой ускоренный метод определения «свой–чужой» микроорганизмов в реакции агглютинации (РА) лечебно-профилактической сывороткой отечественного производства (КИП, лиофилизат иммуноглобулинов IgG, IgA, IgM, разработанный ЗАО «Иммуно-Гем», Москва), тестируемых патогенных, условно-патогенных и доминантных бифидобактерий пробиотического ряда. Параллельно все изученные культуры, зарегистрированные в базах отечественных и международных коллекций, были протестированы методом межмикробного распознавания «свой–чужой», ранее разработанным нами. Было протестировано 16 коллекционных штаммов различных микроорганизмов в РА с указанной лечебно-профилактической сывороткой. Материалом для исследования послужили коллекционные штаммы бактерий *Bifidobacterium bifidum* 791, *Escherichia coli* ЛЭГМ-18, *Klebsiella pneumoniae* 278, *Lactobacillus fermentum* 90Т-С4, *Bifidobacterium longum* МС-42, *Escherichia coli* М-17, *Shigella sonnei* 1776, *Shigella flexneri* 170, *Escherichia coli* 157, *Staphylococcus aureus* 209, *Candida albicans* 10231 и *Salmonella* серовар Enteritidis ATCC 10708. Также в работе были использованы культуры из музея ИКВС УрО РАН, *Bifidobacterium longum* ICIS-505, *Lactobacillus acidophilus* ICIS-1127, *Bifidobacterium bifidum* ICIS-202, *Bifidobacterium bifidum* ICIS-310. Для оценки чужеродности пептидогликана микроорганизмов был также использован метод межмикробного распознавания «свой–чужой» на основе индукции метаболитов тест-штамма *Bifidobacterium longum* МС-42 как «доминанта», путем предварительного соинкубирования с метаболитами исследуемых культур («ассоциантов») и формирования обратной связи в паре «доминант–ассоциант». Оценка результата проводилась по изменению параметров репродукции (рост/размножение) и адаптации (образование биопленок и антилизоцимный тест) микробных культур в соответствии с описанной методикой, после чего производилось сравнение результатов, полученных с использованием этих двух методов микробного распознавания «свой–чужой». Все полученные результаты в РА полностью совпадали с результатами исследований, проведенных ранее методом межмикробного распознавания «свой–чужой» в паре «доминант–ассоциант». Если к этому добавить простоту постановки РА и затраченное на получение результата время (1 сутки против 5 суток при межмикробном распознавании), то РА становится более предпочтительным методом для скрининговых исследований по отбору штаммов для научных и производственных целей.

**Ключевые слова:** персистенция, пептидогликан, метод определения «свой–чужой», реакция агглютинации.

## Адрес для переписки:

Перунова Наталья Борисовна  
460000, Россия, Оренбург, ул. Пионерская, 11,  
Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН.  
Тел.: 8 922 555-30-80.  
E-mail: perunovanb@gmail.com

## Contacts:

Natalia B. Perunova  
460000, Russian Federation, Orenburg, Pionerskaya str., 11,  
Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis UB RAS.  
Phone: +7 922 555-30-80.  
E-mail: perunovanb@gmail.com

## Библиографическое описание:

Бухарин О.В., Перунова Н.Б., Чайникова И.Н., Иванова Е.В., Андриященко С.В. Ускоренный метод определения «свой–чужой» микроорганизмов в реакции агглютинации // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 4. С. 792–796. doi: 10.15789/2220-7619-AAM-1482

## Citation:

Bukharin O.V., Perunova N.B., Chainikova I.N., Ivanova E.V., Andryushchenko S.V. An accelerated method for determining «self/non-self» microorganisms in the agglutination reaction // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 4, pp. 792–796. doi: 10.15789/2220-7619-AAM-1482

Работа выполнена при грантовой поддержке фундаментальных исследований по Программе УрО РАН «Фундаментальные науки – медицине», проект № 18-7-8-34.

© Бухарин О.В. и соавт., 2020

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-AAM-1482>

## AN ACCELERATED METHOD FOR DETERMINING «SELF/NON-SELF» MICROORGANISMS IN THE AGGLUTINATION REACTION

Bukharin O.V., Perunova N.B., Chainikova I.N., Ivanova E.V., Andryushchenko S.V.

*Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation*

**Abstract.** A simple accelerated method for determining «self/non-self» microorganisms by using the agglutination reaction (RA) and therapeutic/prophylactic serum (Immunoglobulin complex preparation, lyophilized IgG, IgA, IgM immunoglobulins, developed by CSC Immuno-Gem, Moscow) is proposed to test for pathogenic, opportunistic and dominant probiotic *Bifidobacteria* spp. In parallel, all the microbial cell cultures examined were registered in the databases of Russia-wide and international collections and tested by the intermicrobial “self/non-self” recognition method, previously developed by us. 16 collection strains of various microorganisms were assessed by the RA with relevant therapeutic and prophylactic serum. Biological samples were obtained from the collection bacterial strains of *Bifidobacterium bifidum* 791, *Escherichia coli* LEGM-18, *Klebsiella pneumoniae* 278, *Lactobacillus fermentum* 90T-C4, *Bifidobacterium longum* MC-42, *Escherichia coli* M-17, *Shigella sonnei* 177b, *Shigella flexneri* 170, *Escherichia coli* 157, *Staphylococcus aureus* 209, *Candida albicans* 10231 and *Salmonella* serovar Enteritidis ATCC 10708. In addition, cell cultures obtained from the Museum of the Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis UB RAS such as *Bifidobacterium longum* ICIS-505, *Lactobacillus acidophilus* ICIS-1127, *Bifidobacterium bifidum* ICIS-202, *Bifidobacterium bifidum* ICIS-310 were also included into the study. To assess microbial peptidoglycan foreignness, the intermicrobial “self/non-self” recognition method was also used based on inducing metabolites produced by the “dominant” test strain *Bifidobacterium longum* MC-42 after pre-incubation with metabolites collected from the studied cell cultures (“associates”) followed by established “dominant–associate” feedback loop. The data were evaluated by assessing change-fold in reproduction (growth/replication) and adaptation (biofilm formation and anti-lysozyme test) of microbial cultures in accordance with the described technique followed by comparing these two methods for intermicrobial “self/non-self” recognition. All the RA data were found to fully agree with those obtained after previous studies by using intermicrobial “self/non-self” recognition method coupled to “dominant–associate” system. Moreover, compared to analogous “intermicrobial recognition” method (5 days), ease of use and test timeframe (24 hours) allow to consider RA attractive for screening studies to select strains for scientific and industrial purposes.

**Key words:** persistence, peptidoglycan, «self/non-self» determination method, agglutination reaction.

## Введение

В инфектологии персистенция микроорганизмов (длительное присутствие патогена в организме хозяина) рассматривается как форма симбиоза про- и эукариотических клеток. При изучении состава клеточной стенки бактерий (как грамположительных, так и грамотрицательных) был определен пептидогликан (ПГ), отсутствующий в эукариотических клетках хозяина. Логично напрашивался вывод, что ПГ, имеющийся у прокариот и отсутствующий у эукариот, может рассматриваться в качестве «биомишени» — мощного раздражителя иммунной системы хозяина [3].

Также были описаны механизмы защиты микробного ПГ от обнаруживающей его иммунной системы организма, такие как экранирование клеточной стенки бактерий (наличие капсулы), секреторные факторы персистенции, потеря ПГ (L-формы бактерий), «антигенная мимикрия» (схожесть детерминант паразита и хозяина). Не исключены и другие механизмы защиты (сохранения ПГ) микробных клеток в организме хозяина [1]: модификация ПГ для обеспечения устойчивости бифидобактерий к природному «антисептику» хозяина — лизоциму [10]; метаболическая сегрегация микроорганизмов.

Все это открывает перспективу в изучении новых механизмов персистенции бифидофлоры [9]. Проблема наличия ПГ в бактериях еще более остро встает при отборе штаммов для создания новых комплексных препаратов пробиотического ряда. Если также учесть, что различные механизмы защиты ПГ у бактерий активно изучаются в последнее время, то приходится лишь сожалеть о том, сколько еще природоподобных технологий не создано, в то время как «инфекционная симбиология» — это базовая платформа для решения подобных вопросов [2, 8].

Разработка нового ускоренного метода определения «свой–чужой» имеет прямое отношение к обозначенной проблеме: как отличить «свои» микроорганизмы от «чужих»? А ведь на этом основано создание новых микробных композиций пробиотического ряда.

## Материалы и методы

Материалом для исследования послужили штаммы бактерий Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт» — ГосНИИгенетика (*Bifidobacterium bifidum* 791, *Escherichia coli* ЛЭГМ-18), отечественной коллекции ГИСК им. Л.А. Тарасевича (*Klebsiella pneumoniae* 278, *Lactobacillus fermentum*

90Т-С4, *Bifidobacterium longum* МС-42, *Escherichia coli* М-17, *Shigella sonnei* 1776, *Shigella flexneri* 170, *Escherichia coli* 157, *Staphylococcus aureus* 209) и коллекции АТСС (*Candida albicans* 10231 и *Salmonella* серовар Enteritidis АТСС 10708). Также в работе были использованы культуры из музея ИКВС УрО РАН, депонированные в ГКНМ ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Габричевского» Роспотребнадзора [*Bifidobacterium longum* ICIS-505 (ГКНМ № 1260), *Lactobacillus acidophilus* ICIS-1127 (ГКНМ № 1274), *Bifidobacterium bifidum* ICIS-202 (ГКНМ № 1257), *Bifidobacterium bifidum* ICIS-310 (ГКНМ № 1258)] [5, 6, 7]. Для проведения агглютинации из исследуемых 12–24-часовых агаровых культур были подготовлены бактериальные взвеси на физиологическом растворе хлорида натрия (3 McF, 1,2 × 10<sup>9</sup> КОЕ/мл).

Для оценки иммунологической активности штаммов был использован комплексный иммуноглобулиновый препарат (КИП) (ЗАО «Иммуно-Гем», Москва), содержащий в своем составе иммуноглобулины классов А, М, G.

Реакцию агглютинации проводили в иммунологических 96-луночных круглодонных стерильных планшетах. С этой целью в каждом ряду лунок готовили двукратные серийные разведения препаратов иммуноглобулинов в физиологическом растворе от 1:2 до 1:1024. Затем в каждую лунку вносили по 0,05 мл (одна капля) взвеси тестируемых микроорганизмов. В качестве контроля использовали цельный раствор препарата иммуноглобулинов и физиологический раствор с исследуемой взвесью микроорганизмов. После встряхивания планшеты помещали в термостат с температурой 37°C на 60 мин, затем 12–15 ч выдерживали при 4°C в холодильнике (для более четкого прочтения результата), после чего оценивали результаты агглютинации. Все реакции агглютинации проводились в дублях в трех независимых исследованиях.

Для оценки чужеродности пептидогликана микроорганизмов был также использован метод межмикробного распознавания «свой–чужой» на основе индукции метаболитов тест-штамма

**Таблица. Сравнительная оценка определения «свой–чужой» микробных культур по степени их чужеродности методом межмикробного распознавания в паре «доминант–ассоциант» и предлагаемым ускоренным методом в реакции агглютинации**

Table. A comparative assessment of the definition of «self/non-self» of microbial cultures by the degree of their foreignness by the method of intermicrobial recognition in a pair of «dominant–associate» and the proposed accelerated method in the agglutination reaction

Вид микроорганизмов Microbial species	Титр агглютинации в РА Agglutination titer in RA	Результат «свой–чужой» “Self/non-self” recognition	
		РА RA	в паре «доминант–ассоциант» in “dominant–associate” system
<i>B. longum</i> МС-42	ЦС/WS	«свой»/“self”	«свой»/“self”
<i>B. longum</i> ICIS-505	ЦС/WS	«свой»/“self”	«свой»/“self”
<i>B. bifidum</i> 791	ЦС/WS	«свой»/“self”	«свой»/“self”
<i>B. bifidum</i> ICIS-310	ЦС/WS	«свой»/“self”	«свой»/“self”
<i>B. bifidum</i> ICIS-202	ЦС/WS	«свой»/“self”	«свой»/“self”
<i>L. acidophilus</i> ICIS-1127	1:2	«свой»/“self”	«свой»/“self”
<i>L. fermentum</i> 90 ТС-4	1:4	«свой»/“self”	«свой»/“self”
<i>E. coli</i> ЛЭГМ-18	1:4	«свой»/“self”	«свой»/“self”
<i>E. coli</i> 157	1:64	«чужой»/“non-self”	«чужой»/“non-self”
<i>K. pneumoniae</i> ICIS-278	1:64	«чужой»/“non-self”	«чужой»/“non-self”
<i>S. aureus</i> 209	1:128	«чужой»/“non-self”	«чужой»/“non-self”
<i>Salmonella</i> Enteritidis АТСС 10708	1:64	«чужой»/“non-self”	«чужой»/“non-self”
<i>E. coli</i> М-17	1:1024	«чужой»/“non-self”	«чужой»/“non-self”
<i>S. sonnei</i> 1776	1:1024	«чужой»/“non-self”	«чужой»/“non-self”
<i>S. flexneri</i> 170	1:1024	«чужой»/“non-self”	«чужой»/“non-self”
<i>C. albicans</i> АТСС 10231	1:1024	«чужой»/“non-self”	«чужой»/“non-self”

**Примечание:** ЦС — цельная (не разведенная) сыворотка; РА — реакция агглютинации.

Note: WS — whole (undiluted) serum; RA — agglutination reaction.

*Bifidobacterium longum* MC-42 как «доминанта», путем предварительного соинкубирования с метаболитами исследуемых культур («ассоциантов») и формированием обратной связи в паре «доминант–ассоциант» [4]. Оценка результата проводилась по изменению параметров репродукции (рост/размножение) и адаптации (образование биопленок и антилизоцимный тест) микробных культур в соответствии с описанной методикой, после чего производилось сравнение полученных результатов с использованием обоих методов микробного распознавания «свой–чужой».

## Результаты

Результаты проведенной работы суммированы в таблице. Как и следовало ожидать, РА всех тестируемых штаммов была выявлена у всех культур с цельной сывороткой (не разведенной), поскольку все исследованные микроорганизмы (независимо от того, «свои» они или «чужие») имели ПГ, то есть ту «биомишень», которая их характеризует. Не трудно видеть, что штаммы нормофлоры, как правило, агглютинировались с цельной сывороткой (ЦС) либо укладывались в рабочее разведение сыворотки 1:2–1:4. Эти штаммы были отнесены в РА к «своим», что очень хорошо согласовывалось с оценкой реакции межмикробного распознавания «свой–чужой» в паре «доминант–ассоциант». Предельно минимальный агглютинационный титр (ЦС 1:2–1:4) имели 8 штаммов: *B. longum* MC-42, *B. longum* ICIS-505, *B. bifidum* 791, *B. bifidum* ICIS-310, *B. bifidum* ICIS-202, *L. acidophilus* ICIS-1127, *L. fermentum* 90 TC-4, *E. coli* ЛЭГМ-18. Результаты оценки этих штаммов, которые отби-

раются для пробиотических композиций, очень важны, и они все оказались в группе «своих».

Иная картина складывалась у бактерий, отнесенных к «чужим». Эти микроорганизмы четко выявили свои количественно-качественные «претензии» к иммунной системе хозяина, продемонстрировав это своими агглютинационными титрами, которые колебались в более широких пределах титров — от 1:16 до 1:1024 — с той же самой сывороткой, отражая явную «чужеродность» тестируемых штаммов.

## Обсуждение

В заключение следует отметить, что проблема определения «своих» и «чужих» микроорганизмов весьма сложна, и детали этого определения выяснены еще не до конца. Четкое разделение «своих» и «чужих» микроорганизмов для иммунной системы хозяина даже для авторов работы было несколько неожиданным. Не исключено, что улучшение биотехнологических препаратов (хорошо очищенная иммуноглобулиновая сыворотка отечественного производства) во многом способствовало получению четких и однозначных результатов. Следует отметить и еще одно важное преимущество описанного «старого» метода РА. Это выигрыш и во времени, и в затратах. Для оценки и постановки РА для указанных целей достаточно 1 дня, тогда как для разработанного нами метода межмикробного распознавания «свой–чужой» необходимо 5 суток.

Отмеченные особенности дают основание рекомендовать этот ускоренный метод постановки РА для получения быстрого ответа в предварительной оценке «свой–чужой» в научных и производственных целях.

## Список литературы/References

1. Андриященко С.В., Перунова Н.Б., Бухарин О.В. Молекулярные механизмы взаимодействия бактерий с лизоцимом и их роль в микросимбиозе // Успехи современной биологии. 2015. Т. 135, № 5. С. 453–463. [Andryuschenko S.V., Perunova N.B., Bukharin O.V. Molecular mechanisms of bacterial interaction with lysozyme and their role in microbiocenosis. *Uspehi sovremennoj biologii = Biology Bulletin Reviews*, 2015, vol. 135, no. 5, pp. 453–463. (In Russ.)]
2. Бухарин О.В. Инфекционная симбиология — новое понимание старых проблем // Вестник РАН. 2016. Т. 86, № 10. С. 915–920. [Bukharin O.V. Infectious symbiology: a new understanding of old problems. *Vestnik Rossiiskoi akademii nauk = Herald of the Russian Academy of Sciences*, 2016, vol. 86, pp. 396–401. doi: 10.7868/S0869587316070033 (In Russ.)]
3. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий. М.: Медицина, 1999. 365 с. [Bukharin O.V. Persistence of bacterial pathogens. *Moscow: Medicine*, 1999. 365 p. (In Russ.)]
4. Бухарин О.В., Перунова Н.Б. Феномен микробного распознавания как медико-биологическая проблема. В кн.: Микросимбиоз. Екатеринбург: УрО РАН, 2014. С. 181–217. [Bukharin O.V., Perunova N.B. Microbial recognition phenomenon as medico-biological problem. In: *Microsymbiocenosis. Ekaterinburg: UrO RAN*, 2014, pp. 181–217. (In Russ.)]
5. Andryuschenko S.V., Ivanova E.V., Perunova N.B., Bukharin O.V. Genome sequence and biochemical properties of *Bifidobacterium longum* strain ICIS-505, isolated from the intestine of a healthy woman. *Microbiol. Recour. Announc.*, 2019, vol. 8, no. 33, pp. e00491–19. doi: 10.1128/MRA.00491-19
6. Andryuschenko S.V., Ivanova E.V., Perunova N.B., Zdvizhkova I.A., Bekpergenova A.V., Bukharin O.V. Draft genome sequence of *Bifidobacterium bifidum* strain ICIS 310 Isolated from a feces of a healthy 5-year-old child from Orenburg. *Microbiol. Recour. Announc.*, 2018, vol. 7, no. 18, pp. e01271–18. doi: 10.1128/MRA.01271–18
7. Andryuschenko S.V., Zdvizhkova I.A., Perunova N.B., Bukharin O.V. Draft genome sequence of *Klebsiella pneumoniae* strain ICIS-278\_PBIV, isolated from the feces of a healthy 59-year-old man from Orenburg, Russia. *Genome Announc.*, 2018, vol. 6, no. 27, pp. e00576–18. doi: 10.1128/genomeA.00576-18.

8. Bukharin O.V. Adaptive strategies of pathogen–host interrelationships under infection. *Her. Russ. Acad. Sci.*, 2018, vol. 88, no. 4, pp. 294–299. doi:10.1134/S1019331618040020
9. Lilja E.E., Johnson D.R. Segregating metabolic processes into different microbial cells accelerates the consumption of inhibitory substrates. *ISME J.*, 2016, vol. 10, no. 7, pp. 1568–1578. doi: 10.1038/ismej.2015.243
10. Sakurai T., Hashikura N., Minami J., Yamada A., Odamaki T., Xiao J.Z. Tolerance mechanisms of human-residential bifidobacterial against lysozyme. *Anaerobe*, 2017, no. 47, pp. 104–110. doi:10.1016/j.anaerobe.2017.05.001

**Авторы:**

**Бухарин О.В.**, академик РАН, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, ФГБУН Оренбургский федеральный исследовательский центр УрО РАН, г. Оренбург, Россия;

**Перунова Н.Б.**, д.м.н., профессор РАН, ведущий научный сотрудник (с исполнением обязанностей зав. лабораторией) лаборатории биомониторинга и молекулярно-генетических исследований Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, ФГБУН Оренбургский федеральный исследовательский центр УрО РАН, г. Оренбург, Россия;

**Чайникова И.Н.**, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории биомониторинга и молекулярно-генетических исследований Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, ФГБУН Оренбургский федеральный исследовательский центр УрО РАН, г. Оренбург, Россия;

**Иванова Е.В.**, д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории биомониторинга и молекулярно-генетических исследований Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, ФГБУН Оренбургский федеральный исследовательский центр УрО РАН, г. Оренбург, Россия;

**Андрющенко С.В.**, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории биомониторинга и молекулярно-генетических исследований Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, ФГБУН Оренбургский федеральный исследовательский центр УрО РАН, г. Оренбург, Россия.

**Authors:**

**Bukharin O.V.**, RAS Full Member, PhD, MD (Medicine), Head Researcher, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch of RAS, Orenburg, Russian Federation;

**Perunova N.B.**, PhD, MD (Medicine), Professor of RAS, Leading Researcher (with the Duties of the Head of the Laboratory), Biomonitoring and Molecular Genetic Research Laboratory, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch of RAS, Orenburg, Russian Federation;

**Chainikova I.N.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Researcher, Biomonitoring and Molecular Genetic Research Laboratory, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch of RAS, Orenburg, Russian Federation;

**Ivanova E.V.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Leading Researcher, Biomonitoring and Molecular Genetic Research Laboratory, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch of RAS, Orenburg, Russian Federation;

**Andryushchenko S.V.**, PhD (Medicine), Senior Researcher, Biomonitoring and Molecular Genetic Research Laboratory, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch of RAS, Orenburg, Russian Federation.

## ПАМЯТИ ВАЛЕНТИНА ИВАНОВИЧА ПОКРОВСКОГО



В четверг 29 октября 2020 года не стало лидера отечественной медицины, большого ученого и педагога, поистине великого врача, наставника российских инфекционистов и эпидемиологов, основателя врачебной династии академика РАН, доктора медицинских наук, профессора Валентина Ивановича Покровского, советника директора по инновации Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии Роспотребнадзора, лауреата Государственной премии, премии Правительства Российской Федерации.

Жизненный путь Валентина Ивановича насыщен выдающимися достижениями, а его мудрость и энергия вызывают восхищение.

Блестящие научные и организаторские способности академика В.И. Покровского, высокий профессионализм, целеустремленность и трудолюбие на многие годы определили вектор развития отечественной медицинской науки в области эпидемиологии и инфекционных болезней, чем спасли тысячи жизней, в первую очередь — детских. Под его руководством подготовлено около 70 докторских и 140 кандидатских диссертаций, опубликовано более 600 научных работ, в том числе 18 монографий. Его научные работы приобрели хрестоматийный характер, их значимость и актуальность не утрачены и в наши дни.

На протяжении 47 лет Валентин Иванович руководил Центральным научно-исследовательским институтом эпидемиологии, завоевавшим за эти годы статус ведущего научного учреждения в России и в мире. Этому способствовал разработанный Валентином Ивановичем комплексный подход к изучению инфекционных болезней, предполагающий анализ клинического течения, эпидемиологии, микробиологии, клинической иммунологии, молекулярных механизмов патогенеза и иммуногенеза, разработку принципиально новых методов диагностики.

В тяжелые для медицинской науки годы Валентин Иванович встал у руля Академии медицинских наук Советского Союза и возглавлял все медицинское академическое сообщество бесценно на протяжении 19 лет. Под его руководством академия не только сохранила, но и приумножила свой потенциал, был разработан ряд государственных научных программ, реорганизована структура Российской академии медицинских наук, созданы ее новые региональные центры в районах Крайнего Севера, Сибири, в южных районах страны. Развитие фундаментальных исследований

в медицине, сохранение и пополнение золотого фонда отечественных ученых — все это было бы невозможно без такого дипломатичного, увлеченного и болеющего душой за свое дело лидера, как Валентин Иванович!

Вклад В.И. Покровского в развитие отечественной науки и медицины был неоднократно отмечен государственными наградами (орден Трудового Красного Знамени, орден Ленина, орден «За заслуги перед Отечеством» III степени, II степени), Государственной премией, премией Правительства Российской Федерации, благодарностью Президента Российской Федерации.

И пусть его слова: «Каждый из нас носит в сердце напутствия своего учителя, а потому и вечна традиция российской медицины: отдавать больному все силы своей души», — на долгие годы останутся девизом для новых поколений врачей!

Умер великий ученый, гордость и легенда отечественной медицины, выдающийся общественный деятель!

## 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 <a href="http://www.e-library.ru">www.e-library.ru</a> . 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](http://www.agrk.org) — индекс 41392.  
Цена свободная.  
Подписка на электронную версию журнала  
на сайте [www.elibrary.ru](http://www.elibrary.ru)**

# АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Агарков Н.М.	755	Климова Е.А.	747	Федонюк Л.Я.	671
Алексеева Л.А.	625	Коваль Г.Д.	671	Филатова Е.Н.	707
Андрюшенко С.В.	792	Коняев Д.А.	755	Чайникова И.Н.	792
Анисимов А.П.	735	Косова А.А.	686	Чалапа В.И.	686
Афиногенов Г.Е.	639	Кулабухов А.С.	755	Чухраев А.М.	755
Афиногенова А.Г.	639	Кулова Е.А.	707	Шеховцева Ю.А.	671
Башкирова Е.С.	686	Любимова А.В.	747	Яблоков М.М.	755
Белан Э.Б.	762	Мамаева Т.А.	717	Antipova A.Yu.	729
Белова Л.В.	747	Маркелова О.А.	782	Asgari N.	655
Бичурина М.А.	717	Машин Т.И.	686	Bancevic M.	729
Богачева Н.В.	769	Мезенцева Е.А.	609	Bichurina M.A.	729
Бродина Т.В.	747	Мелешко А.А.	639	Biyabanaki F.	655
Букина Ю.В.	671	Мордык А.В.	775	Danesh Pouya F.	789
Бурова Н.А.	762	Наумова М.А.	717	Emerole K.C.	664
Бухарин О.В.	792	Панева М.А.	775	Esteki R.	655
Везикова Н.Н.	782	Перунова Н.Б.	792	Filipovic-Vignjevic S.	729
Вольнкина А.С.	735	Попова Е.В.	755	Ghomi R.	655
Гашикова Н.М.	769	Пузырева Л.В.	775	Golub V.P.	664
Говорухина М.В.	717	Реколсавская Н.И.	695	Hajiheydari A.	655
Гончаров А.Е.	747	Салаяв Р.К.	695	Kharlamova T.V.	664
Горелик Е.Ю.	625	Сахарнов Н.А.	707	Konnov V.V.	664
Губарь А.А.	671	Свиридова Н.И.	762	Kozhevnikova G.M.	664
Губка В.А.	671	Силин А.В.	747	Lavrentieva I.N.	729
Долгушин И.И.	609	Синяков А.А.	741	Nasirinasab F.	655
Дубянский В.М.	735	Скрипченко Н.В.	625	Nemati M.	789
Жаркин Н.А.	762	Смирнова О.В.	741	Polovinkina N.A.	664
Железникова Г.Ф.	625	Спиридонова А.А.	639	Rasmi Y.	789
Железнова Н.В.	717	Столбиков А.С.	695	Roshni Asl E.	789
Жирков А.А.	625	Титова Н.М.	741	Stoiljkovic V.	729
Зильбер Э.К.	782	Ткаченко Л.В.	762	Tokmalaev A.K.	664
Зуева Л.П.	747	Толстой В.П.	639	Tumolskaya N.I.	664
Зырянова Д.П.	769	Топтыгина А.П.	717	Zavoikin V.D.	664
Иванова Е.В.	792	Тотменин А.В.	769	Zheleznova N.V.	729
Камышный А.М.	671	Уткин О.В.	707		

# ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

активные формы кислорода	741	кишечно-ассоциированная	671	слезная жидкость	755
аллергические заболевания	782	лимфоидная ткань	671	специфические антитела класса IgG	717
антибиотикорезистентность	639	кожа	609	специфические антитела класса IgM	717
антигенные детерминанты	695	корь	717	сплайсинг	707
антимикробная активность	639	легкие	609	судорожный синдром	625
антиретровирусная терапия	769	метаанализ	686	тяжелое течение	707
апоптоз	707	метод определения «свой—чужой»	792	Финляндия	782
атопия	782	микробном	671	хемокины	625
бактероиды	671	микробные биопленки	639	хронический гастрит	741
вакцинация	686	модель ВИЧ-1	769	хронический эндометрит	762
ванкомицин	671	нанокompозиты	639	цитокиновый статус	762
вирулентный потенциал	747	наночастицы металлов	639	цитокины	625
вирус Эпштейна—Барр	707	наночастицы оксидов металлов	639	чума	735
вирусный энцефалит	625	нейроспецифические белки	625	штамм	735
ВИЧ-инфекция	775	нейтрофильные гранулоциты	609	экспрессия	671
возрастная структура	717	низкоавидные антитела	717	экспрессия генов	707
ВПЧ16 L1	695	осложнение	707	энцефалопатия	625
ВПЧ18 L1	695	пептидогликан	792	autoinfection	664
ВПЧ31 L1	695	первичный иммунный ответ	717	incidence	729
ВПЧ45 L1	695	персистенция	792	Ivermectin	664
вторичный иммунный ответ	717	пневмония	775	measles	729
высокоавидные антитела	717	пожилые пациенты	755	MLVA	735
генотипирование	747	поражение зубов	747	NF-κB	789
гены вирулентности	747	потребители инъекционных	775	Northwest Russia	729
гиперпластические процессы		наркотиков	741	Parthenolide	789
эндометрия	762	предраковые состояния желудка	735	<i>S. mutans</i>	747
гомеостаз	609	природный очаг	735	SARS-CoV-2	655
дети	625, 686	прогнозирование	735	Serbia	729
динамика атопии	782	продолженное действие	639	<i>Strongyloides stercoralis</i>	664
ДНК-биочип	707	ПЦР-РВ	671	strongyloidiasis	664
женский репродуктивный тракт	609	пятивалентная живая оральная		vaccination	729
жизненный цикл	609	вакцина	686	VNTR локусы	735
заболеваемость корью	717	распространенность	782		
закрытоугольная глаукома	755	реакция агглютинации	792		
иммунопатология	755	репарация	609		
интерлейкины	755	репродуктивный период	762		
инфекции нижних дыхательных		Россия	782		
путей	775	ротавирусная инфекция	686		
инфекционные изоляты ВИЧ-1	769	ротавирусный гастроэнтерит	686		
инфекционные молекулярные		ротавирусная инфекция	609		
клоны ВИЧ-1	769	ротавирусная инфекция	609		
инфекционный мононуклеоз	707	сальмонелла	671		
кишечник	609	свободнорадикальное окисление	741		
		серотипирование	747		