

УЧРЕДИТЕЛИ:
ВСЕРОССИЙСКОЕ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО
ЭПИДЕМИОЛОГОВ, МИКРОБИОЛОГОВ И ПАРАЗИТОЛОГОВ

СОЮЗ ПЕДИАТРОВ РОССИИ

ООО «С-ИНФО»

ЖУРНАЛ МИКРОБИОЛОГИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ИММУНОБИОЛОГИИ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор В. В. ЗВЕРЕВ, д.б.н., проф., акад. РАН

Ю.В.АНАНЬИНА, д.м.н., проф., член-корр. РАН; Н.И.БРИКО, д.м.н., проф., акад. РАН;
О.В.БУХАРИН, д.м.н., проф., акад. РАН; А.Л.ГИНЦБУРГ, д.м.н., проф., акад. РАН;
С.Г.ДРОЗДОВ, д.м.н., проф., акад. РАН; А.В.КАРАУЛОВ, д.м.н., проф., член-корр. РАН;
В.В.КУТЫРЕВ, д.м.н., проф., акад. РАН; В.В.МАЛЕЕВ, д.м.н., проф., акад. РАН;
М.И.МИХАЙЛОВ, д.м.н., проф., член-корр. РАН; М.И.НАРКЕВИЧ; Г.Г.ОНИЩЕНКО, д.м.н.,
проф., акад. РАН; В.И.ПОКРОВСКИЙ, д.м.н., проф., акад. РАН; Р.И.СЕПИАШВИЛИ, д.м.н.,
проф., акад. АН Грузии; В.П.СЕРГИЕВ, д.м.н., проф., акад. РАН; Арег А.ТОТОЛЯН, д.м.н., проф.,
член-корр. РАН; Н.Н.ФИЛАТОВ, д.м.н., проф.; Н.Д.ЮЩУК, д.м.н., проф., акад. РАН

Двухмесячный научно-практический журнал

Основан в 1924 г.

2

март—апрель

МОСКВА 2016

«С-ИНФО»

СОСТАВ РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА:

АДАМБЕКОВ Д.А. (Бишкек), БРУСИНА Е.Б. (Кемерово), ЗУЕВА Л.П. (Санкт-Петербург), КОРОЛЮК А.М. (Санкт-Петербург), МАГАЗОВ Р.Ш. (Уфа), МЕЛЬНИЧЕНКО П.И. (Москва), МИНИН Г.Д. (Уфа), ПРИСАКАРЬ В.И. (Кишинев), СОЛОДОВНИКОВ Ю.П. (Москва), ТИТОВ Л.П. (Минск), ФРОЛОВ А.Ф. (Киев), ШАРКОВА В. (Владивосток), ШВАГЕР М.М. (Ростов), ШЕНДЕРОВ Б.А. (Москва), ШКАРИН В.В. (Н.Новгород), ШУРАТОВ И.Х. (Алматы), ЯСТРЕБОВ В.К. (Омск)

Адрес редакции и издателя:
121059, Москва, ООО «С-инфо», а/я 88,
редакция ЖМЭИ (для отправки статей и запросов о прохождении статей)
Телефон редакции: (495) 796-92-91 (не для справок о прохождении статей)

Зав. редакцией Л.В.Иваничева

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору
в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций.
Свидетельство ПИ № ФС77-36745

Индексы $\begin{matrix} 71436 \\ 16729 \end{matrix}$: 1 111 р. 44 к. (цена за полугодие)

<http://www.jmicrobiol.com>

**Журнал входит в базу данных: PubMed, Scopus, Web of Science, Chemical Abstract.
Журнал входит в перечень ВАКовских изданий**

**УВАЖАЕМЫЕ ЧИТАТЕЛИ И АВТОРЫ ЖМЭИ!
ПОДДЕРЖИТЕ ЖУРНАЛ, ПОДПИСАВШИЕСЬ
НА II ПОЛУГОДИЕ 2016 Г. ИНДЕКСЫ ПОДПИСКИ СМ. ВЫШЕ.**

Подписано в печать 16.03.16. Выход в свет 05.04.16. Формат 70x108 1/16
Печать офсетная. Тираж 1000. Заказ 23-2016

Отпечатано в АО «Красная Звезда»
123007, Москва, Хорошевское шоссе, д. 38
Тел.: (495)941-28-62, (495)941-34-72, (495)941-31-62
www.redstarph.ru
E-mail: kr_zvezda@mail.ru

© «С-инфо», 2016

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

О.Н.Вишневецкая, О.В.Рыбальченко, И.В.Ларионов, О.Г.Орлова, А.Г.Марков*

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПЛОТНЫХ КОНТАКТОВ ЭПИТЕЛИЯ ТОЩЕЙ КИШКИ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА И ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА

Санкт-Петербургский государственный университет, *ГосНИИ особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург

Цель. Сравнительное исследование плотных контактов и ультраструктурных изменений энтероцитов слизистых оболочек тощей кишки крыс при действии липополисахаридов и холерного токсина. *Материалы и методы.* Применяли липополисахариды (Sigma-Aldrich, Германия) и холерный токсин (Sigma-Aldrich, Германия). Исследование проводили на крысах линии Wistar. Воздействие липополисахаридов и холерного токсина на эпителиоциты осуществляли методом выведения сегментов тощей кишки крысы и их инкубации с указанными веществами. Проведен сравнительный анализ ультратонких срезов энтероцитов тощей кишки крыс и плотных контактов между ними в контроле и при воздействии липополисахаридов и холерного токсина. *Результаты.* Воздействие липополисахаридов на ультраструктуру энтероцитов тощей кишки крысы проявлялось в изменении формы клеток в результате увеличения межклеточного пространства без деструкции плотных контактов. В некоторых эпителиоцитах отмечено исчезновение десмосом, увеличение ядер и большая выраженность ЭПС. Воздействие холерогена на эпителиоциты слизистой оболочки тощей кишки крысы по ряду признаков сходно с действием липополисахаридов, что проявлялось в изменении ультраструктуры клеток, форма которых также трансформировалась в результате увеличения межклеточного пространства, деструкцией плотных контактов этот процесс не сопровождался. При действии холерного токсина наблюдали исчезновение складчатости латеральной области плазматической мембраны клеток и сокращение числа микроворсинок. *Заключение.* Выявлен сходный характер воздействия липополисахаридов и холерного токсина на ультраструктуру клеток и область плотных контактов энтероцитов тощей кишки крысы, оба вещества вызывали увеличение межклеточного пространства без деструкции плотных контактов.

Журн. микробиол., 2016, № 2, С. 3—9

Ключевые слова: холерный токсин, липополисахарид, энтероциты, плотные контакты, ультраструктура, трансмиссионная электронная микроскопия

O.N.Vishnevskaya, O.V.Rybalchenko, I.V.Larionov, O.G.Orlova, A.G.Markov*

COMPARATIVE ANALYSIS OF TIGHT JUNCTIONS OF EPITHELIUM OF RATS JEJUNUM UNDER THE EFFECT OF LIPOPOLYSACCHARIDE AND CHOLERA TOXIN

St. Petersburg State University, *State Research Institute of Ultra Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russia

Aim. Comparative study of tight junctions and ultrastructure alterations of enterocytes of mucous membranes of jejunum of rats under the effect of lipopolysaccharides and cholera toxin. *Materials and methods.* Lipopolysaccharides (Sigma-Aldrich, Germany) and cholera toxin (Sigma-Aldrich, Germany) were used. The study was carried out in Wistar line rats. Effect of lipopolysaccharides and cholera toxin on epitheliocytes was carried out by a method of withdrawal of segments of rat jejunum and their incubation with the specified substances. Comparative analysis of ultrathin sections of enterocytes of jejunum of rats and tight junctions between them was carried out in control and under the effect of lipopolysaccharides and cholera toxin. *Results.* Effect of lipopoly-

saccharides on ultrastructure of enterocytes of rat jejunum manifested in the change of cell form as a result of increase of intercellular space without destruction of tight junctions. Disappearance of desmosomes, increase of nuclei and more pronounced ER were noted in some epitheliocytes. Effect of cholero-gen on epitheliocytes of mucous membrane of rat jejunum by a number of signs is similar to the effect of lipopolysaccharides, that manifested in an alteration of ultrastructure of cell, the form of those also transformed as a result of an increase of intercellular space, this process was not accompanied by destruction of tight junctions. Disappearance of folding of the lateral region of plasmatic membrane of cells and a reduction of a number of microvilli was observed under the effect of cholera toxin. *Conclusion.* A similar character of effect of lipopolysaccharides and cholera toxins on ultrastructure of cells and region of tight junctions of enterocytes of rat jejunum was detected, both substances caused an increase of intercellular space without the destruction of tight junctions.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 2, P. 3—9

Key words: cholera toxin, lipopolysaccharide, enterocytes, tight junctions, ultrastructure, transmission electron microscopy

ВВЕДЕНИЕ

Межклеточные контакты в настоящее время являются пристальным объектом изучения и одним из наиболее приоритетных направлений развития висцеральной физиологии — исследования роли тканевых барьеров в осуществлении транслокации бактериальных токсинов и самих бактерий из желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) в лимфу и системный кровоток. Повышение концентрации микробных токсинов способствует развитию разнообразных патологических процессов в организме человека, при этом одним из лидирующих этиологических факторов являются липополисахариды (ЛПС) — эндотоксины грамотрицательных бактерий. Показано также, что термолабильные энтеротоксины различных условно патогенных энтеробактерий, в том числе *Escherichia coli*, также как и холероген *Vibrio cholerae*, вызывают увеличение проницаемости слизистых оболочек ЖКТ [14]. Барьерная функция эпителия является ключевой при развитии воспалительных заболеваний кишечника, при этом нормальное функционирование эпителия требует постоянного поддержания баланса между реактивностью и толерантностью к микроорганизмам просвета кишечника. При хронических воспалительных процессах, а также при дисбактериозе кишечника условно патогенные микроорганизмы (УПМ), колонизируя слизистые оболочки тонкой кишки и образуя биопленки, могут стать источником бактериального эндотоксина — ЛПС. При нарушении структуры эпителиального пласта происходит транслокация бактерий и их токсинов в лимфатическую и кровеносную системы. На проницаемость эпителиального кишечного барьера оказывают влияние различные факторы: состояние клеток в слизистой оболочке кишечника, окислительный стресс, клеточная гипоксия, увеличение кислотности и уровня провоспалительных цитокинов.

Регуляция проницаемости эпителия является ключевым звеном в осуществлении избирательного транспорта ионов, веществ и воды в различных органах. Открытие белков, формирующих плотные контакты (апикальные межклеточные структуры, обеспечивающие развитие эпителиального транспортного фенотипа и создающие барьер для движения ионов и веществ по межклеточному пути), поставило задачу по изучению механизмов регуляции парацеллюлярного транспорта. Обнаружено, что избирательная проницаемость эпителия напрямую зависит от молекулярного состава плотных контактов эпителия [8]. К основным белкам плотных контактов относятся: окклюдин [10], клаудины [11]. По своим эффектам эти белки можно подразделить на две группы. Так, клаудины 2, 7, 12, 15, 16 формируют селективные ионные поры [6]. В свою очередь, клаудины 1, 3, 4, 5, 8, 14,

18, 19 снижают проницаемость эпителия [7]. Особенно важным является факт взаимодействия этих белков с различными веществами, включая бактериальные токсины, которые вызывают изменение количественного и качественного представительства этих белков в плотных контактах, а также их локализацию [9, 13]. Действие токсинов бактериального происхождения на молекулярный состав плотных контактов эпителия кишки свидетельствует о том, что компоненты химуса могут быть источником соединений, регулирующих проницаемость эпителия. При этом показано, что термолабильные энтеротоксины кишечных палочек и других условно патогенных энтеробактерий, вызывая увеличение проницаемости слизистых оболочек кишечника, стимулируют скачкообразное сокращение и обильную секрецию. К таким токсинам относятся холерный токсин и ЛПС.

Холерный токсин представляет собой аргинин-специфическую АДФ-рибозилтрансферазу, которая, рибозилируя регуляторную субъединицу аденилатциклазы, вызывает ее устойчивую активацию в энтероцитах, что в конечном итоге приводит к открытию хлорных каналов на апикальной поверхности клетки. Хлор выходит из клетки, а по межклеточному пространству в просвет кишки перемещаются ионы натрия и вода.

ЛПС постоянно образуется в просвете ЖКТ при естественной гибели грамотрицательных бактерий и может оказывать токсическое действие на макроорганизм, например, индуцируя синтез повреждающих цитокинов и других медиаторов воспаления [1]. Следует отметить, что до сих пор остается невыясненной роль ЛПС в изменении структуры плотных контактов и их участие в транслокации бактерий — комменсалов через эпителий тонкой кишки. В процессе исследования роли тканевых барьеров при нормальном функционировании кишечника и при различных патологиях (например, при действии различных токсинов и ЛПС в значительных концентрациях) необходимо оценивать барьерные свойства эпителия, а также анализировать вклад белков плотных контактов в этот процесс. Участие ЛПС в транслокации бактерий из просвета кишечника в лимфу и системный кровоток в контексте изменения барьерных свойств эпителиоцитов на электронно-микроскопическом уровне до настоящего времени не рассматривалось. Для того, чтобы выяснить, каким образом условно патогенные энтеробактерии и холерные вибрионы, а именно их ЛПС и холерный токсин, влияют на эпителий тощей кишки и структуру плотных контактов, а также сравнить действие двух различных токсинов, в настоящей работе использовали трансмиссионную электронную микроскопию.

Цель настоящей работы — сравнительный электронно-микроскопический анализ плотных контактов и ультраструктурных изменений энтероцитов тощей кишки крыс при действии ЛПС и холерного токсина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали липополисахариды из *Escherichia coli* O111:B4 производства Sigma-Aldrich (Германия) и холероген из *Vibrio cholerae* производства Sigma-Aldrich (Германия). Исследование проводили на крысах линии Wistar.

Опыты проводили на самцах крыс линии Wistar ($n=12$) массой 250 — 300 г. Все процедуры с крысами проводили в соответствии с правилами работы с экспериментальными животными. После умерщвления у животных продольно рассекали кожу на вентральной поверхности туловища, после этого делали разрез мышц по белой линии, проводили препарирование ЖКТ и выводили петли тощей кишки наружу. Выведенную петлю с двух сторон перевязывали лигатурами для введения исследуемых веществ в выделенный сегмент. В контрольной группе в полость кишки вводили физиологический раствор, в опытных группах крысам вводили ЛПС (20 мкг/мл) и холерный токсин (1 мкг/мл). Через 2 часа инкубации сегмент тощей кишки с исследуемым веществом отделяли и помещали в фиксатор для

электронно-микроскопического исследования. Для получения ультратонких срезов ткань фиксировали 2,5% раствором глутаральдегида в растворе Хенкса (рН=7,0) в течение 2 ч при температуре 4°C. Затем отмытые раствором Хенкса пробы подвергали вторичной фиксации 1% раствором четырехоксида осмия (OsO₄) на основе того же раствора Хенкса в течение 2 ч при температуре 4°C. Фиксированные OsO₄ клетки после отмывки раствором Хенкса помещали в 2% раствор уранилацетата на ацетатном буфере (рН=5,2) при 40°C на 1 час. Отмытые ацетатным буфером препараты обезвоживали в серии этилового спирта возрастающей концентрации, в смеси спирта и ацетона и в ацетоне. Затем их заливали в смолу Spurr. Срезы готовили на ультратоме LKB-8800 (Швеция). Окраску срезов проводили по методу Reynolds уранилацетатом и цитратом свинца. Препараты просматривали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-100С (Япония) [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ

На ультратонких срезах эпителиоциты тощей кишки контрольной ткани имели характерную цилиндрическую форму с гликокаликсом и микроворсинками на апикальной мембране (рис. 1). В цитоплазме клеток обнаруживали митохондрии, на апикальной поверхности клеток расположены микроворсинки и комплекс плотных контактов

Воздействие ЛПС на клетки слизистой оболочки тощей кишки крыс приводило к значительному увеличению межклеточного пространства по сравнению с контролем, при этом деструкции плотных контактов не наблюдали (рис. 2). На электронограммах большей части клеток в области плотных контактов отсутствовали десмосомы. В отдельных клетках существенно увеличивалось ядро и зона, занимаемая ЭПС, при этом возрастало число митохондрий. При воздействии ЛПС в зоне, приближенной к апикальной части слизистой оболочки, отмечали появление тучных клеток, заполненных гранулами (рис. 3).

На электронно-микроскопическом уровне при действии холерного токсина на клетки слизистой оболочки тощей кишки наблюдали расширение межклеточного пространства по сравнению с контролем (рис. 4). Структура плотных контактов в этих клетках оставалась без изменений. При этом в клетках слизистой оболочки тощей кишки отмечали значительное увеличение числа митохондрий. На апикальной поверхности клеток выявлено снижение числа микроворсинок, а в латеральной области эпителиоцитов — исчезновение характерной складчатости плазматической мембраны.

При действии холерного токсина отмечено появление большого числа бокаловидных клеток (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Повышенная проницаемость слизистых оболочек кишечника является основным фактором риска при распространении бактерий транслокационным путем [1]. Эпителий, являясь важным элементом тканевых барьеров, обеспечивает избирательный транспорт для передвижения ионов и макромолекул, а также создает препятствие для их проникновения в подлежащие ткани. Контроль за проницаемостью эпителиального слоя осуществляет апикальный межклеточный комплекс — плотные контакты, в состав которого входят белки семейства клаудинов. Холерный токсин может изменять проницаемость плотных контактов, и в модельных опытах подтверждено, что этот эффект опосредован изменением экспрессии белков клаудинов [5]. Ранее установлено, что поликатионное соединение протамин при действии с апикальной стороны эпителиоцитов меняет их межклеточную проницаемость и ультраструктуру плотных контактов [4]. Полученные данные позволяют предположить, что при действии

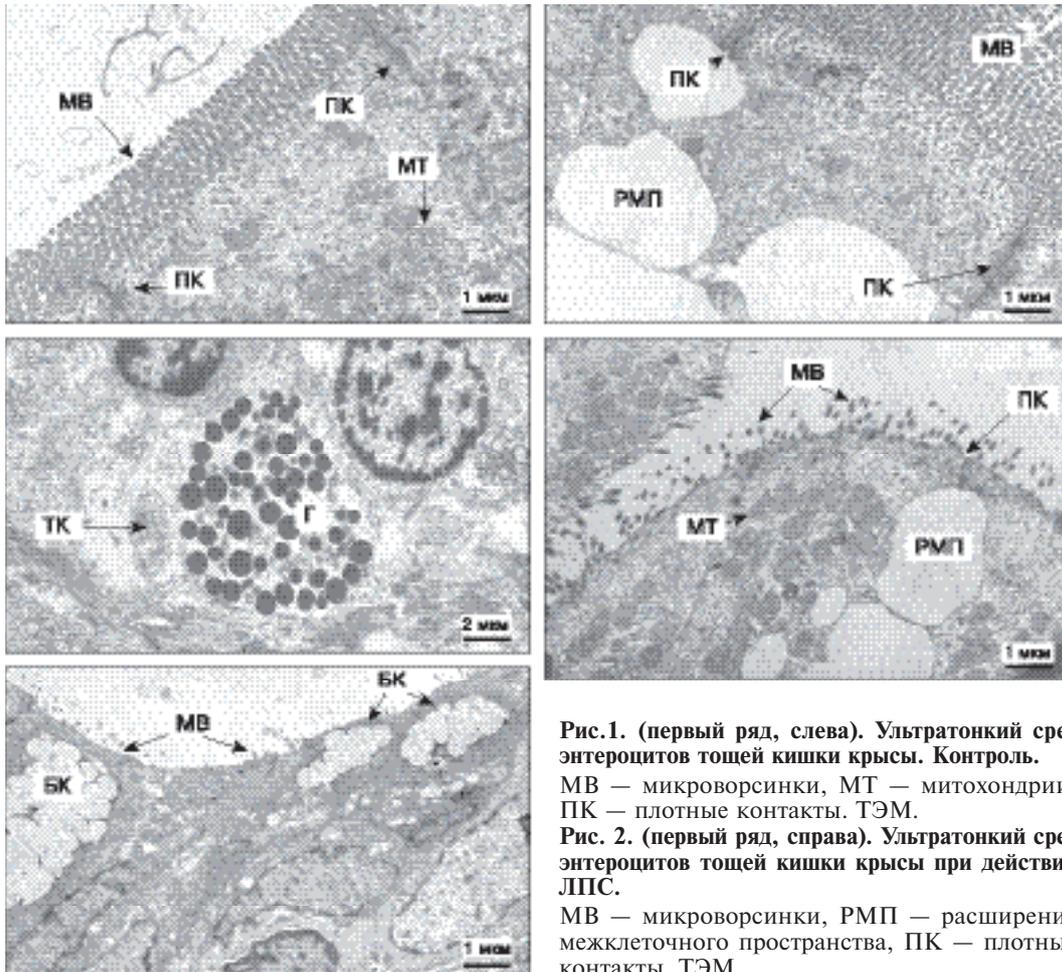


Рис.1. (первый ряд, слева). Ультратонкий срез энтероцитов тощей кишки крысы. Контроль.

МВ — микроворсинки, МТ — митохондрии, ПК — плотные контакты. ТЭМ.

Рис. 2. (первый ряд, справа). Ультратонкий срез энтероцитов тощей кишки крысы при действии ЛПС.

МВ — микроворсинки, РМП — расширение межклеточного пространства, ПК — плотные контакты. ТЭМ.

Рис. 3. (второй ряд, слева), Ультратонкий срез фрагмента тучной клетки тощей кишки крысы при действии ЛПС.

ТК — тучная клетка, Г — гранулы. ТЭМ.

Рис. 4. (второй ряд, справа), Ультратонкий срез энтероцитов тощей кишки крысы при действии холерного токсина.

МВ — микроворсинки, МТ — митохондрии, РМП — расширение межклеточного пространства, ПК — плотные контакты. ТЭМ.

Рис. 5. (слева, третий сверху). Ультратонкий срез бокаловидной клетки тощей кишки крысы при действии холерного токсина.

МВ — микроворсинки, БК — бокаловидные клетки. ТЭМ.

ЛПС барьерные свойства эпителия тонкой кишки крысы также способны к изменению. Кроме того, известно о негативном воздействии собственной дисбиотической микробиоты кишечника, при массивном росте которой формируется новый ассоциативный патомикробиоценоз, в дальнейшем становящийся источником эндогенной инфекции. Увеличение численности грамотрицательных бактерий в кишечнике, как правило, сопровождается наводнением кровотока ЛПС, который рассматривается, в первую очередь, как иммуномодулирующий фактор патогенности [2].

Для оценки роли эпителия при контакте с эндотоксином и было проведено сравнительное электронно-микроскопическое исследование плотных контактов при действии ЛПС и холерогена. Анализ ультратонких срезов показал, что дейст-

вие ЛПС и холерного токсина на плотные контакты и структуру эпителиоцитов тощей кишки не было полностью идентичным, несмотря на значительную общность ответных реакций.

По данным электронной микроскопии в обоих случаях отмечали резкое увеличение размеров межклеточного пространства на фоне отсутствия деструктивных изменений в области плотных контактов, при этом обращала на себя внимание слабо развитая система десмосом. Следует отметить, что в отдельных клетках наблюдали увеличение ядер и более выраженное развитие ЭПС как при действии ЛПС, так и при контакте с холерогеном.

К особому влиянию ЛПС следует отнести увеличение численности тучных клеток, значительную роль в дегрануляции которых играет цАМФ. Известно, что на многие воздействия, в том числе на микробные токсины и фрагменты клеток бактерий, тучные клетки отвечают стереотипной реакцией — увеличением количества клеток и выбросом медиаторов из гранул [12]. К особенностям воздействия холерогена на эпителиоциты слизистой оболочки тощей кишки можно отнести исчезновение складчатости латеральной области плазматической мембраны клеток и сокращение числа микроворсинок. Особое влияние холерогена следует отметить на бокаловидные клетки слизистой оболочки кишки, численность которых при его воздействии значительно увеличивалась.

Таким образом, сравнительный электронно-микроскопический анализ клеток и области плотных контактов эпителия тощей кишки крыс после воздействия ЛПС и холерного токсина выявил изменения в ультраструктуре энтероцитов при отсутствии деструкции плотных контактов. Однако действие исследуемых веществ нельзя считать полностью идентичным, несмотря на одинаковый ответ эпителиоцитов в виде расширения межклеточного пространства и практически полную сохранность целостности плотных контактов. Дальнейшее исследование проницаемости слизистых оболочек тонкой кишки при воздействии таких токсических метаболитов, как ЛПС и холерный токсин, наряду с оценкой ультратонкого строения эпителиоцитов требует комплексного анализа плотных контактов с использованием молекулярно-генетических методов. Решение вышеизложенных задач поможет ответить на основной вопрос: может ли при воздействии ЛПС меняться проницаемость эпителия в сторону усиления транслокации микроорганизмов.

По-видимому, именно сочетание молекулярно-генетических исследований с анализом барьерных свойств эпителия, в том числе на электронно-микроскопическом уровне, помогут прояснить, каким образом происходит инфицирование макроорганизма представителями, скорее всего, дисбиозной нормальной микрофлоры кишечника и какие факторы способствуют скорейшей транслокации бактерий в лимфу и системный кровоток.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 15-04-074-64.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бондаренко В.М., Рябиченко Е.В. Роль транслокации кишечной бактериальной аутофлоры и ее токсических биомолекул в патологии человека. Эксперим. клин. гастроэнтерол. 2007, 5: 86-93.
2. Бондаренко В.М., Лиходед В.Г. Диагностика, лечение и профилактика эндотоксинемии. Лечение и профилактика. 2012, 2 (3): 70-76.
3. Рыбальченко О.В. Электронно-микроскопическое исследование межклеточных взаимодействий микроорганизмов при антагонистическом характере взаимоотношений. Микробиология. 2006, 75 (4): 550-555.
4. Рыбальченко О.В., Бондаренко В.М., Фальчук Е.Л., Лебедькова Ю.А., Марков А.Г. Действие холерогена и протамина на плотные контакты энтероцитов и колоноцитов крыс. Журн. микробиол. 2012, 6: 3-7.

5. Alzamora R., O'Mahony F., Harvey B.J. Estrogen inhibits chloride secretion caused by cholera and Escherichia coli enterotoxins in female rat distal colon. *Steroids*. 2011, 76: 867-876.
6. Amasheh S., Meiri N., Gitter A.H. et al. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J. Cell Sci.* 2002, 115: 4969-4976.
7. Amasheh M., Schlichter S., Amasheh S. Quercetin enhances epithelial barrier function and increases claudin-4 expression in Caco-2 cells. *J. Nutr.* 2008, 138 (6): 1067-1073.
8. Angelow S., Yu A. S. Claudins and paracellular transport: an update. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2007, 16 (5): 459-464.
9. Berkes J., Viswanathan V. K., Savkovic S. D., Hecht G. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut*. 2003, 52 (3): 439-451.
10. Furuse M., Hirase T., Itoh M. et al. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* 1993, 123 (6, pt 2): 1777-1788.
11. Furuse M., Fujita K., Hiiragi T. et al. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell Biol.* 1998, 141 (7): 1539-1550.
12. He S.H. Key role of mast cells and their major secretory products in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 2004, 10 (3): 309-318.
13. Katahira J., Inoue N., Horiguchi Y. et al. Molecular cloning and functional characterization of the receptor for Clostridium perfringens enterotoxin. *J. Cell Biol.* 1997, 136 (6): 1239-1247.
14. Sack D.A., Sack R.B., Nair G.B., Siddique A.K. Cholera. *Lancet*. 2004, 363 (9404): 223-233.

Поступила 10.05.15

Контактная информация: Рыбальченко Оксана Владимировна, д.б.н., проф.,
199106, С.-Петербург, ВО, 21 линия, 8а

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

В.П.Терлецкий^{1,2}, В.И.Тыщенко^{1,2}, О.Б.Новикова², И.И.Новикова³, Э.Д.Джавадов²

НОВЫЙ ПОДХОД К ГЕНОТИПИРОВАНИЮ ГОСПИТАЛЬНЫХ ИЗОЛЯТОВ CLOSTRIDIUM DIFFICILE

¹Всероссийский НИИ генетики и разведения сельскохозяйственных животных, Санкт-Петербург-Пушкин; ²Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства, Санкт-Петербург-Ломоносов; ³Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург-Пушкин

Цель. Разработка нового подхода в генотипировании Clostridium difficile и испытание его на примере 140 госпитальных изолятов. *Материалы и методы.* Подход основан на идее двойного расщепления и избирательного мечения (ДРИМ), использованного ранее при генотипировании других бактериальных патогенов. Был осуществлен подбор оптимальных ферментов рестрикции MluI и Mph1103I, оптимизированы условия проведения реакции ДРИМ. *Результаты.* Проведено генотипирование госпитальных изолятов C.difficile, рассчитан индекс дискриминации штаммов, сделаны выводы о возможностях метода в выяснении путей распространения и идентификации источников инфекции. *Заключение.* Разработанный метод генотипирования имеет ряд преимуществ над существующими методами и может применяться в решении вопросов эпидемиологии инфекций, вызванных C.difficile.

Журн. микробиол., 2016, № 2, С. 9—15

Ключевые слова: геномная ДНК, бактерии, Clostridium difficile, генотипирование, молекулярная эпидемиология, ферменты рестрикции

A NOVEL APPROACH TO GENOTYPING OF HOSPITAL ISOLATES OF *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*

¹All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Agricultural Animals, St. Petersburg-Pushkin; ²All-Russian Research Veterinary Institute of Poultry, St. Petersburg-Lomonosov; ³All-Russian Research Institute of Plants Protection, St. Petersburg-Pushkin, Russia

Aim. Development of a novel approach in genotyping of *Clostridium difficile* and its testing on the example of 140 hospital isolates. *Materials and methods.* The approach is based on an idea of double digest and selective label (DDSL), used previously during genotyping of other bacterial pathogens. Selection of optimal enzymes for restriction of MluI and Mph1103I was carried out, condition of DDSL reaction execution were optimized. *Results.* Genotyping of *C. difficile* hospital isolates was carried out, index of strain discrimination was calculated, conclusions regarding possibilities of the method in elucidation of spread pathways and identification of infection sources were made. *Conclusion.* The developed method of genotyping has a number of advantages over the existing method and can be used to address issues in epidemiology of infections caused by *C. difficile*.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 2, P. 9—15

Key words: genome DNA, bacteria, *Clostridium difficile*, genotyping, molecular epidemiology, restriction enzymes

ВВЕДЕНИЕ

Clostridium difficile является одним из наиболее распространенных и опасных микроорганизмов в спектре внутрибольничных инфекций, обнаруживается в микрофлоре кишечника у 80% здоровых детей в возрасте до 1 года и у 1 — 5% здоровых взрослых. В то же время, у госпитализированных взрослых носительство может достигать 20 — 40% [2].

Несмотря на значительное число публикаций по эпидемиологии *C. difficile*, остается спорным вопрос об эндо- и экзогенном характере инфекции и путях передачи возбудителя [1]. Внутрибольничные случаи заболевания могут носить как спорадический, так и эпидемический характер. Эпидемическое распространение получают лишь отдельные штаммы, например риботип 1 и риботип 027, производящие в 20 раз больше токсинов А и В, чем другие патогенные штаммы [8, 11]. Кроме того, отмеченные штаммы устойчивы ко многим широко используемым антибиотикам [6].

Эффективный контроль над вспышками заболевания возможен при быстрой идентификации изолятов, позволяющей дифференцировать эпидемические и спорадические штаммы. В отношении *C. difficile* разработаны и используются несколько методов генотипирования. Наиболее распространенным сейчас в Европе является метод риботипирования, основанный на вариабельности интергенного участка между 16S и 23S генами рибосомной ДНК. В США предпочтение отдают методу пульс-гель электрофореза. Используется также метод выявления вариаций тандемных повторов ДНК (MLVA) и секвенирование генов домашнего хозяйства (MLST). К сожалению, эти методы не лишены недостатков. В частности, риботипирование часто не различает эпидемиологически неродственные изоляты, т.е. обладает недостаточной дискриминационной способностью. Пульс-гель электрофорез проводится в течение длительного времени и требует значительных материальных и людских затрат [7]. Секвенирование является дорогостоящей процедурой и иногда не позволяет добиться необходимого уровня дискриминации штаммов [4].

Целью нашего исследования было адаптировать разработанный ранее метод двойного расщепления и избирательного мечения (ДРИМ) к геному *C.difficile*. Метод ДРИМ доказал свою эффективность в прямых сравнениях с пульс-гель электрофорезом на клинических изолятах *Pseudomonas aeruginosa* в условиях госпиталя кантона Во в Швейцарии [10]. Метод технически не сложен, основан на использовании обычного лабораторного оборудования, имеет высокую дискриминационную способность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В анализ включили 140 чистых культур *C.difficile*, выделенных от пациентов стационара и отделения интенсивной терапии кантонального госпиталя в Швейцарии. На первом этапе стояла задача выделения геномной ДНК из этого микроорганизма. Стандартная процедура экстракции ДНК в отношении *C.difficile* не подходит, так как клеточная стенка этой грамм-положительной бактерии резистентна к лизоциму. Испытание ряда методик позволило подобрать оптимальный метод выделения ДНК. Ночную культуру *C.difficile*, выращенную в анаэробных условиях в контейнере, центрифугировали в 1,5 мл пробирках типа эппендорф в течение 5 минут при 8000 g. Осадок бактериальных клеток суспендировали в 200 мкл 50 mM ЭДТА (этилендиаминтетраацетат), в суспензию вносили лизоцим в концентрации 100 мг/мл до конечной концентрации 10 мг/мл. Инкубировали смесь при 37°C 10 минут. Короткого времени инкубации с лизоцимом было достаточно для частичного нарушения целостности клеточной стенки. Дальнейшее разрушение стенки достигалось внесением 200 мкл лизирующего буфера следующего состава: 5 M гуанидинтиоцианат, 25 mM ЭДТА, 2% лаурилсаркозин, 1% тритон X100. После инкубации в течение 1 минуты в смесь вносили додецилсульфат натрия (SDS) до конечной концентрации 1%, инкубацию продолжали при комнатной температуре 1 минуту. После этого вносили равный объем (примерно 500 мкл) смеси фенол-хлороформ, пробирки встряхивали 3 минуты и центрифугировали при 12 000g в течение 10 минут. Отбирали верхнюю водную фазу, содержащую ДНК, в новую пробирку. ДНК осаждали равным объемом пропанола, промывали в 70% этаноле, подсушивали на воздухе и растворяли в 50 мкл буфера TE (10 mM трис, 1 mM ЭДТА, pH 8,0). Через 30 минут растворения ДНК готова к использованию для генотипирования.

Метод ДРИМ основан на одновременном расщеплении геномной ДНК микроорганизма двумя рестрикционными эндонуклеазами [9, 10] и избирательном мечении отдельных фрагментов ДНК. Одна из рестриктаз при расщеплении ДНК образует ограниченное число фрагментов с так называемыми липкими концами, которые включают биотинилированный дезоксицитозинтрифосфат (Bio-14-dCTP, Invitrogen™). В то же время, многочисленные фрагменты ДНК, образованные второй рестриктазой, дают только тупые либо 5'-усеченные концы, которые не включают метку. Такая избирательность мечения позволяет уменьшить число

Ферменты рестрикции для уменьшения размера фрагментов ДНК в ферментативной реакции ДРИМ и их основные характеристики

| Фермент | Сайт расщепления | Число сайтов в геноме <i>C.difficile</i> | Оптимальный буфер | Эффективность лигирования (%) |
|----------|------------------|--|-------------------|-------------------------------|
| Mph1103I | ATGCA'T | 1222 | R | 95 |
| Eco32I | GAT'ATC | 755 | R | 95 |
| BsuRI | GG'CC | 937 | R | 95 |
| HincII | GTY'RAC | 1402 | Tango™ | 95 |
| Bst1107I | GTA'TAC | 1091 | O | 90 |

фрагментов ДНК с нескольких тысяч до нескольких десятков и выявить эти фрагменты на фильтре после их разделения по размеру в обычном агарозном геле. При отборе ферментов уделяли внимание также способности проявлять активность в одном буфере, специфичности, коммерческой доступности и цене. Ряд ферментов-кандидатов, удовлетворяющих требованиям ДРИМ, представлены

в табл. Все ферменты рестрикции и реакционные буфера были произведены Thermo Fisher Scientific™.

Анализ по программе *in-silico* [3] позволил подобрать оптимальную комбинацию ферментов рестрикции для каждого биологического вида патогена. В частности, для *S.difficile* лучшими ферментами были MluI (39 сайтов расщепления) и Mph1103I (1222 сайтов расщепления).

Метод ДРИМ включает в себя следующие последовательные этапы: а) реакцию двойного расщепления и избирательного мечения, б) электрофорез в 0,8% агарозном геле, в) перенос в дистиллированной воде фрагментов ДНК на нейлоновый фильтр, г) детекция сигнала.

Протокол ДРИМ очень прост: в пробирку вносили 15 мкл воды, 2 мкл буфера для рестриктаз, 2 мкл ДНК и 1 мкл ферментной смеси. Ферментную смесь из расчета на одну реакцию делали путем смешивания двух ферментов рестрикции MluI и Mph1103I (2 — 3 е.а.), Taq-полимеразы (0,2 е.а.) и Bio-14-dСТР (конечная концентрация 0,1 мкМ). Пробирку ставили в термостат на 1 — 2 часа. После этого смесь вносили в лунки для агарозного электрофореза. Разделение фрагментов ДНК осуществляли в течение 16 часов (ставили на ночь). Результатом генотипирования методом ДРИМ является группа фрагментов ДНК в виде окрашенных полос на фильтре, распределение которых специфично для каждого штамма. После окончания реакции ДРИМ продукты двойного расщепления и мечения вносили в лунки стандартного 0,8% агарозного геля. Электрофорез проводили в течение 3 часов при напряжении 150 вольт в условиях рециркуляции буфера (обычный трис-ацетатный буфер), длина геля равна 25 см.

MLVA анализ проводили на этих же изолятах с использованием подхода Zaiss N. H. et al. [12]. Использовали следующие праймеры для амплификации полиморфных tandemных повторов: TR6-F 5'-TTTCAACTTGTCAGTTTTTAAGTC-3'; TR6-R 5'-ATGACATAGCGTTTTGTGGAAT-3'; TR10-F 5'-TGCATCAAATTGGTCAAGACTC-3'; TR10-R 5'-TGAAATCATTGACTATAAAGCAAAA-3'.

Амплификацию проводили с использованием 1 мкл геномной ДНК *S.difficile*, 200 мкМ каждого из четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, 0,1 мкМ праймеров, 1хПЦР буфер, 1 е.а. Hot Start Taq-полимеразы (Invitrogen™). После начальной денатурации ДНК при 96°C в течение 3 минут проводили 35 циклов при 96°C 45 секунд, 52°C 45 секунд, 72°C 45 секунд. Заканчивали реакцию инкубированием при 72°C в течение 7 минут. Общий объем смеси составлял 25 мкл, реакция проводилась в стандартных 96-луночных планшетах. После завершения ПЦР продукты реакции разделяли в агарозном геле, окрашивали флуоресцентным красителем GelRed™ (Bio-Rad™), фотографировали в системе гель-документации.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Испытание различных комбинаций ферментов рестрикции в реакции ДРИМ позволило найти оптимальное сочетание (MluI и Mph110I). В этом случае типичная картина содержит около 40 фрагментов ДНК, равномерно расположенных вдоль фильтра (рис. 1).

Размер фрагментов ДНК составлял от 400 до 20 000 пар оснований. Используемый формат электрофорезной камеры и гребенки для формирования лунок позволил анализировать 24 штамма одновременно. При этом для удобства учета положения фрагментов ДНК на фильтре на каждую седьмую дорожку вносили референтный штамм *S.difficile*. В качестве референтного штамма в ходе предварительных экспериментов отбирали штамм, имеющий сравнительно равномерное распределение фрагментов в максимально широком диапазоне. Генетически идентичные штаммы выявляются в виде одинакового набора фрагментов ДНК на разных электрофоретических дорожках (например, штаммы 18041 и 18042). Близкие штаммы отличаются друг от друга на 1 — 3 фрагмента (штамм

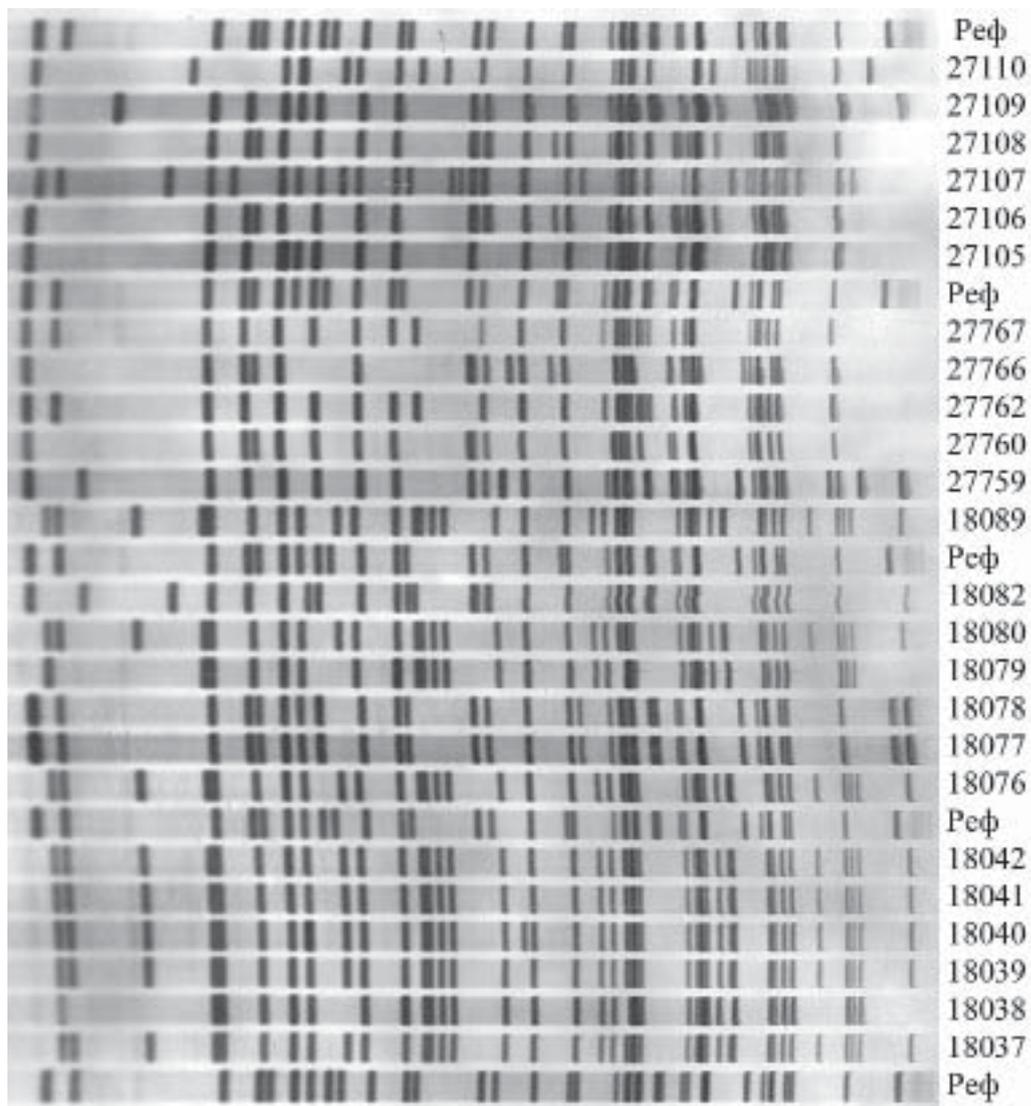


Рис. 1. Генотипирование группы изолятов *C.difficile* методом ДРИМ.

Реф — референтный штамм, изоляты обозначены согласно номенклатуре в базе данных госпиталя.

18040 и 18041/18042). Генетически удаленные штаммы имели различное распределение многих фрагментов ДНК.

Из 140 изолятов были выявлены 117 неродственных штаммов (бактериальных генотипов), индекс дискриминации *D*, рассчитываемый по критерию Hunter P.R. and Gaston M.A. [5] был равен 0,98. Было выявлено 2 пациента, у которых обнаруживались одновременно по 2 близкородственных штамма, отличающихся всего на 1 — 3 фрагмента ДНК.

Эпидемиологические данные о нахождении пациентов в одних или соседних палатах и данные генотипирования позволили сделать вывод о том, что наряду с передачей инфекции между пациентами играет существенную роль и эндогенный характер заболевания. В частности, идентичность штаммов, выделенных у разных пациентов, находившихся в одной палате, свидетельствует о передаче инфекции. В ряде других случаев у пациентов из одной палаты выделяли совершенно разные

генотипы *S. difficile*, что подтверждает отсутствие эпидемического характера заболевания. Здесь можно говорить об эндогенном источнике заболевания, когда иммунная система не способна препятствовать размножению бактерий и микроорганизм приобретает свойства вирулентности в силу экспрессии генов экзотоксинов.

Метод MLVA, основанный на двух локусах TR6 и TR10 [12] выявил полиморфизм в тандемных повторах *S. difficile*, однако количество вариантов было ограниченным. Нам удалось наблюдать всего два размера ампликонов, дискриминационная способность двухлокусного MLVA оказалась низкой. Несмотря на это метод дает легко интерпретируемые результаты, разница в размере ампликонов достаточно большая для объективного анализа (рис. 2).

Такой подход можно рекомендовать для предварительной оценки генетического разнообразия в группах изолятов. Нужно отметить, что данный метод, в отличие от ДРИМ, не обладает 100% типированностью, т.е. отдельные изоляты не могут быть типированы в силу отсутствия амплификата. В частности, такими оказались изоляты 27109 и 27110. Изоляты 27760 и 27762 имели не только отличающиеся от остальных изолятов ампликоны, но и выраженные различия в распределении фрагментов ДНК при генотипировании методом ДРИМ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Разработанный метод ДРИМ позволяет выявлять одновременно до 40 фрагментов ДНК, что значительно больше, чем при использовании метода пульс-гель электрофореза. Объясняется такая особенность предлагаемого метода коротким временем проведения и односторонним направлением электрического поля стандартного геля электрофореза, что позволяет получать четко различимые фрагменты ДНК. В случае пульс-гель электрофореза время анализа достигает 24 — 48 часов при изменяющемся направлении тока. Эти условия определяют существенную диффузию фрагментов ДНК в геле, выявляемые полосы становятся широкими, что ограничивает возможность учета большого количества фрагментов (как правило, не более 15 — 20). Естественно, большее число учитываемых фрагментов означает большую дискриминационную способность метода, что мы и наблюдали в отношении других микроорганизмов [10]. Весь анализ, включая выделение геномной ДНК *S. difficile*, выполняется в течение одного рабочего дня. Метод не требует дорогостоящего специализированного оборудования, так как не основан на геномном секвенировании и полимеразной цепной реакции, прост и удобен в применении. Получаемый результат в виде фрагментов ДНК может легко документироваться с использованием любого сканера и программ анализа изображений, таких как BioNumerics™. Программа позволяет не только идентифицировать бактериальные штаммы, но и объединять штаммы в генетически родственные группы (кластеры), строить филогенетическое древо и т.д.

Тестирование двухлокусного метода генотипирования, основанного на полиморфизме тандемных повторов MLVA в варианте Zaiss N.H. et al. [12], на нашем наборе изолятов *S. difficile* показало, что этот метод не отличается достаточной

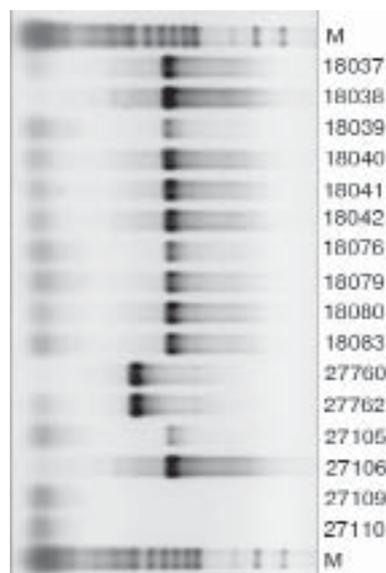


Рис. 2. Фрагмент планшеты с группой изолятов *S. difficile*, генотипированных методом MLVA по двум локусам.

М — маркер длин фрагментов ДНК.

дискриминационной способностью и может использоваться лишь в качестве предварительного скрининга. Если эпидемиологически неродственные изоляты не будут иметь отличий при MLVA скрининге, их необходимо генотипировать более высокоразрешающими методами, такими как ДРИМ. Таким образом, метод ДРИМ, отличаясь простотой и быстротой выполнения анализа, позволяет проводить идентификацию штаммов *C.difficile* с высоким разрешением. В наших исследованиях возможности метода генотипирования ДРИМ были показаны на выборке из 140 госпитальных изолятов микроорганизмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лобзин Ю.В., Захаренко С.М., Иванов Г.А. Современные представления об инфекции *Clostridium difficile*. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2002, 4 (3): 200-232.
2. Barlett J.C. Narrative review: the new epidemic of *Clostridium difficile*-associated enteric disease. *Ann. Intern. Med.* 2006, 145 (10): 758-764.
3. Bikandi J., San Millan R., Rementeria A. et al. In silico analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR, and endonuclease restriction. *Bioinformatics.* 2004, 20 (5): 798-799.
4. Fakhr M.K., Nolan L.K., Logue C.M. Multilocus sequence typing lacks the discriminatory ability of pulsed-field gel electrophoresis for typing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43 (5): 2215-2219.
5. Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of the Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 1988, 26: 2465-2466.
6. Joost I., Speck K., Herrmann M. et al. Characterization of *Clostridium difficile* isolates by *slpA* and *tcdC* gene sequencing. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2009, 33: 13-18.
7. Mitani N., Koizumi A., Sano R. et al. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by PCR-RFLP and its usefulness in an epidemiological study of an outbreak. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2005, 58 (4): 250-252.
8. Stubbs S.L., Brazier J.S., O'Neill G.L. et al. PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. *J. Clin. Microbiol.* 1999, 37: 461-463.
9. Terletski V., Schwarz S., Carnwath J., Niemann H. Typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Choleraesuis, Typhimurium, Dublin and laboratory strains of *Escherichia coli* using subtracted restriction fingerprinting (SRF). *Microbiol. Res.* 2003, 158 (2): 135-142.
10. Terletskiy V., Kuhn G., Francioli P. et al. Application and evaluation of double digest selective label (DDSL) typing technique for *Pseudomonas aeruginosa* hospital isolates. *J. Microbiol. Methods.* 2008, 72 (3): 283-287.
11. Wiegand P.N., Nathwani D., Wilcox M.H. et al. Clinical and economic burden of *Clostridium difficile* infection in Europe: a systematic review of healthcare-facility-acquired infection. *J. Hosp. Infect.* 2012, 81: 1-14.
12. Zaiss N.H., Rupnik M., Kuijper E.J. et al. Typing *Clostridium difficile* strains based on tandem repeat sequences. *BMC Microbiol.* 2009, 9: 6.

Поступила 15.06.15

Контактная информация: Терлецкий Валерий Павлович, д.б.н., проф.,
196625, Санкт-Петербург-Пушкин, Московское ш., 55 а, р.т. (812)451-76-63

ХАРАКТЕРИСТИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПРОБИОТИЧЕСКОГО ШТАММА *LACTOBACILLUS FERMENTUM* 90 TC-4

¹НИИ эпидемиологии и микробиологии им. И.Н. Блохиной, ²НПО «Микроген», Нижний Новгород

Цель. Подтверждение таксономического положения штамма *Lactobacillus fermentum* 90 TC-4 с использованием фенотипических (классический микробиологический, MALDI TOF масс-спектрометрия) и генетических (секвенирование фрагмента гена 16S рРНК и полногеномное секвенирование) методов. *Материалы и методы.* Объект исследования — штаммы *L. fermentum* 90 TC-4 из различных коллекций. Масс-спектрометрический анализ осуществляли с помощью MALDI TOF масс-спектрометра Autoflex (Bruker Daltonics, Германия), изучение биохимических свойств штамма проводили с использованием стрипов API 50 CH_L (Biomerieux, Франция), для выделения геномной ДНК использовали набор «ДНК-сорб В» (ЦНИИЭ, Москва). Секвенирование наработанных фрагментов гена 16S рРНК проводили на секвенаторе GenomeLab™ GeXP (Beckman Coulter, США), полногеномное секвенирование выполняли на платформе MiSeq (Illumina). Сборка генома и биоинформационный анализ осуществляли с использованием программы BLAST (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), «CLC Bio Assembly» и геномного сервера RAST (<http://rast.nmpdr.org>). *Результаты.* Установлено, что штамм *L. fermentum* 90 TC-4 в ряде случаев загрязнен культурой *L. plantarum*. В результате идентификации чистой культуры штамма *L. fermentum* 90 TC-4 с использованием спектра высокотехнологичных методов доказано, что данный штамм относится к виду *L. fermentum*. *Заключение.* Подтвержден таксономический статус штамма *L. fermentum* 90 TC-4.

Журн. микробиол., 2016, № 2, С. 16—23

Ключевые слова: *Lactobacillus fermentum*, пробиотические штаммы лактобацилл, MALDI TOF масс-спектрометрия, полногеномное секвенирование

А.Г.Точилина¹, И.В.Белова¹, И.В.Соловьева¹, И.С.Горлова², Т.П.Иванова¹, В.А.Жирнов¹

CHARACTERISTICS OF BIOLOGICAL AND MOLECULAR-GENETIC PROPERTIES OF *LACTOBACILLUS FERMENTUM* 90 TC-4 PROBIOTIC STRAIN

¹Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, ²«Microgen», Nizhny Novgorod, Russia

Aim. Confirmation of taxonomic position of *Lactobacillus fermentum* 90 TC-4 strain using phenotypic (classic microbiological, MALDI TOF mass-spectrometry) and genetic (16S rRNA gene segment sequencing and full genome sequencing) methods. *Materials and methods.* Object of the study — *Lactobacillus fermentum* 90 TC-4 strains from various collections. Mass-spectrometric analysis was carried out using Autoflex MALDI TOF mass-spectrometer (Bruker Daltonics, Germany), study of biochemical properties of the strain was carried out using API 50 CHL strips (Biomerieux, France), “DNA-sorb B” kit was used for isolation of genome DNA (CRIE, Moscow). Sequencing of the accumulated fragments of 16S rRNA gene was carried out using GenomeLab GeXP sequencing (Beckman Coulter, USA), full genome sequencing was carried out in MiSeq platform (Illumina). Assembly of genome and bioinformation analysis was carried out using BLAST program (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi), «CLC Bio Assembly» and genome server RAST (rast.nmpdr.org). *Results.* *L. fermentum* 90 TC-4 strain was established to be contaminated by *L. plantarum* culture in a series of cases. As a result of identification of a pure culture of *L. fermentum* 90 TC-4 strain using a specter of high-technology methods, membership of the strain in *L. fermentum* species has been proven. *Conclusion.* Taxonomic status of *L. fermentum* 90 TC-4 strain was confirmed.

Key words: *Lactobacillus fermentum*, lactobacilli probiotic strains, MALDI TOF mass-spectrometry, full genome sequencing

ВВЕДЕНИЕ

В течение длительного времени в промышленной микробиологии для производства пробиотиков используют одни и те же штаммы рода *Lactobacillus*. Их свойства изучены, штаммы технологичны и позволяют получать большой выход биомассы. Тем не менее, при повторном изучении этих штаммов с использованием современных наукоемких методов, таких как ПЦР и секвенирование, могут быть получены результаты, ставящие под сомнение видовую принадлежность этих микроорганизмов. Так, на основе проведенных молекулярно-генетических исследований штамм *Lactobacillus fermentum* 90 ТС-4 был реклассифицирован и ему было присвоено новое название — *Lactobacillus plantarum* 90 ТС-4 [1—3]. Поскольку этот штамм успешно используется в биотехнологии при производстве пробиотиков с конца прошлого века и по настоящее время, установление его таксономического статуса является принципиальным вопросом, кроме того, в настоящее время точная идентификация штаммов-продуцентов пробиотиков с использованием молекулярно-генетических методов регламентирована соответствующими нормативными документами [4, 5].

L. fermentum 90 ТС-4 был выделен А.А. Ленцнером и Х.П. Ленцнер (Тартуский государственный университет, Эстония) от здорового человека. В результате изучения биологических свойств была установлена его принадлежность к виду *L. fermentum*. Штамм был передан в Нижегородский (тогда Горьковский) НИИЭМ в 1967 году. В 1969 году был разработан лабораторный регламент производства сухого лактобактерина, и в качестве штамма-продуцента был использован данный штамм.

Начиная с 1970 года на протяжении пяти лет этот штамм лиофильно высушивали в Горьковском НИИЭМ и Пермском институте вакцин и сывороток для передачи на хранение в ГИСК им. Л.А.Тарасевича. На настоящий момент штамм находится на хранении во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) под номером № В-7582, в Научном Центре экспертизы средств медицинского назначения (ранее ГИСК им. Л.А.Тарасевича) — № 57, в Государственной коллекции нормальной микрофлоры МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского, в Государственной коллекции лактобацилл Нижегородского НИИЭМ им. И.Н.Блохиной, в рабочих коллекциях маточных культур на филиалах НПО «Микроген».

С учетом новых данных о реклассификации *L. fermentum* 90 ТС-4 [1—3], актуальным является изучение свойств и установление таксономического статуса данного штамма, хранящегося в коллекциях, с использованием спектра фенотипических и генетических методов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования — лиофильно высушенные штаммы *L. fermentum* 90 ТС-4 из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов, из коллекции Научного центра экспертизы средств медицинского назначения, Государственной коллекции лактобацилл НИИЭМ им. И.Н.Блохиной, заложенные на хранение в 1969, 1994, 2000, 2014 годах, а также из коллекции маточных культур НПО «Микроген» в г. Нижний Новгород «Нижегородское предприятие по производству бактериальных препаратов «ИмБио».

Лиофильно высушенные штаммы восстанавливали и готовили II генерацию

культуры с использованием среды MPC-1 (Lactobacillus MRS broth, HiMedia), среды MPC-4 (Lactobacillus MRS agar, HiMedia) и газогенерирующих пакетов GasPak Anaerobe Gas Generating Pouch System with Indicator, США.

Выросшие колонии оценивали по морфологии, по 15 колоний каждого морфологического вида отбирали для следующего этапа исследования: образец из каждой колонии наносили на 3 ячейки мишени для последующей масс-спектрометрии и остаток засеивали в MPC-1 для последующей биохимической идентификации. Для биохимической идентификации отбирали культуры, по результатам масс-спектрометрии имевшие значения Score 2,100 и более, для проведения секвенирования гена 16S рРНК было отобрано по три чистые культуры штамма с типичным биохимическим профилем и наиболее высокими значениями Score. В работу по полногеномному секвенированию отбирали культуру штамма с подтвержденным по MALDI TOF и секвенированию 16S рРНК таксономическим статусом, типичным для вида биохимическим профилем, имеющую максимально высокий Score.

Масс-спектрометрический анализ осуществляли с помощью времяпролетного MALDI масс-спектрометра Autoflex (Bruker Daltonics, Германия), внешнюю калибровку проводили с применением бактериального тест-стандарта (Bruker Daltonics, Германия), в качестве матрицы использовали α -циано-4-гидроксикоричную кислоту (-CHCA). Для проведения MALDI масс-спектрометрического профилирования белков изучаемых штаммов проводили экстракцию с использованием муравьиной кислоты согласно руководству пользователя MALDI BioType, кластеризацию и анализ спектров проводили с использованием программ BioType OS, FlexAnalysis (Bruker). В качестве референс масс-спектров для кластерного анализа использовались масс-спектры лактобацилл из базы данных Bruker и масс-спектры штаммов из собственной базы данных НИИЭМ им. И.Н.Блохиной.

Расширенное изучение биохимических свойств штамма проводили с использованием стрипов API 50 CHL (Biomerieux, Франция), пробоподготовку, культивирование, идентификацию микроорганизмов и интерпретацию полученных результатов осуществляли согласно инструкциям производителя.

Для постановки ПЦР гена 16S рРНК геномную ДНК выделяли методом нуклеосорбции с использованием набора «ДНК-сорб В» (ЦНИИЭ, Москва), использовали стандартные реагенты производства ЦНИИЭ и специфические праймеры: FL 3'-gag ttt gat cct ggc tca gga-5', RL 3'-cga cga cca tga acc acc tgt-5' [8]. Праймеры синтезированы ЗАО «Синтол» (Москва). ПЦР проводили на приборе «Терцик-МС2» («ДНК-технология», Москва).

Электрофорез продуктов амплификации выполняли в 1,5% агарозном геле, содержащем 5 мкг/мл бромида этидия, в течение 40 мин при 100 В на гель в трис-боратном буферном растворе. Очистку амплифицированного фрагмента от агарозного геля для последующего секвенирования проводили с помощью набора для очистки ДНК (ООО «Цитокин», Санкт-Петербург).

Секвенирование наработанных фрагментов гена 16S рРНК выполняли с использованием секвенатора GenomeLab™ GeXP (Beckman Coulter). Полученные сиквенсы анализировали в программе BLAST (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) и MEGA [10].

Для проведения полногеномного секвенирования геномную ДНК выделяли с использованием коммерческого набора QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Германия), подготовку библиотек проводили с использованием набора TrueSeq (Illumina Inc, США), секвенирование выполняли на платформе MiSeq (Illumina), сборку генома и биоинформационный анализ осуществляли с использованием программного обеспечения «CLC bio assembly» и геномного сервера RAST (<http://rast.nmpdr.org>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

При расसेве штаммов *L. fermentum* 90 TC-4 на плотную питательную среду МРС-4 наблюдали серые звездчатые плоские шероховатые колонии диаметром 2 — 5 мм. В мазках отмечали полиморфные грамположительные палочки одинаковой толщины и разной длины — от кокков до длинных нитей, то есть морфология характерна для вида *L. fermentum*.

В ряде случаев наблюдали два вида колоний: белые блестящие выпуклые с ровными краями от 0,5 до 3 мм в диаметре и серые звездчатые плоские шероховатые диаметром 2 — 5 мм. В мазках клеток колоний первого типа наблюдали грамположительные бесспорные палочки средних размеров, равномерно окрашенные, расположенные поодиночке или в виде коротких цепочек — морфология культуры характерная для *L. plantarum*. В мазках колоний второго типа наблюдали полиморфные грамположительные палочки одинаковой толщины и разной длины — от кокков до длинных нитей, то есть морфология характерна для вида *L. fermentum*. Оба вида культуры были далее идентифицированы с использованием масс-спектрометрии и классического биохимического метода.

При MALDI TOF идентификации установлено, что культура, образующая серые шероховатые звездчатые колонии, относится к виду *L. fermentum*. Высокие значения Score values (от 1,922 до 2,217, категория А) достоверно подтверждают принадлежность культуры к данному виду. Культура, образующая белые блестящие выпуклые колонии, в свою очередь, идентифицирована как *L. plantarum*, значения Score values варьировали от 1,862 (категория В) до 2,091 (категория А). На рис. 1 показаны масс-спектры, характерные для *L. plantarum* и *L. fermentum* 90 TC-4, а также сопоставление полученных спектров с референсными спектрами из базы данных Bruker.

Таким образом, при восстановлении, рассева и идентификации штамма *L. fermentum* 90 TC-4 методом MALDI TOF масс-спектрометрии установлено, что в ряде случаев данный штамм был загрязнен культурой *L. plantarum*.

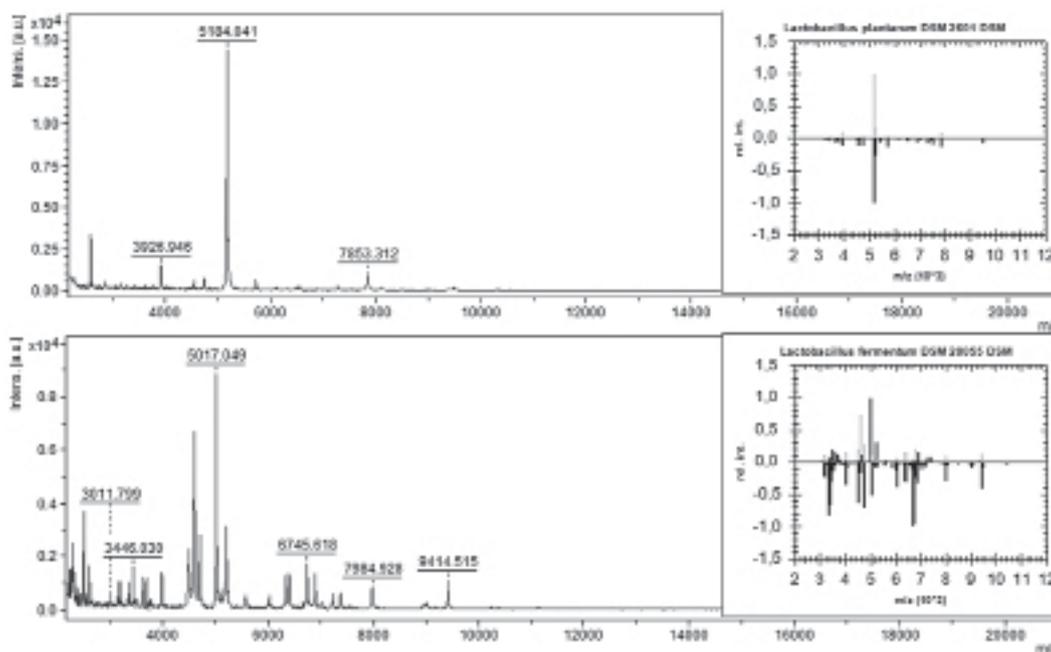


Рис. 1. MALDI масс-спектры экстрактов клеток штаммов *L. plantarum* и *L. fermentum* 90 TC-4 при использовании α -CHCA матрицы.

На следующем этапе работы были получены и проанализированы индивидуальные масс-спектры и масс-листы чистых культур штамма *L. fermentum* 90 TC-4. Хотя снятие масс-спектров осуществляли в диапазоне 2000 — 20 000 m/z, визуально наиболее информативным является участок от 2000 до 10 000 m/z.

Метод MALDI масс-спектрометрии позволяет выявлять уникальный набор рибосомальных белков для каждого из исследуемых микроорганизмов. Принцип метода основан на измерении массы ионизированного вещества. При MALDI-ионизации образуются однозарядные ионы, т.е. один ион соответствует одному белку. В то же время, несколько белков могут иметь одинаковую массу и при масс-спектрометрии формировать один пик. При формировании масс-спектра полученные ионы выстраиваются в порядке возрастания масс, при этом интенсивность (высота) пиков не учитывается. При идентификации микроорганизмов учитывается весь набор пиков, а не отдельные пики.

Результаты белкового профилирования можно получить не только в графическом виде (масс-спектры), но и в табличном (масс-листы). При сравнении полученных масс можно выявить родовые, видовые и штаммовые особенности микроорганизмов — наличие в спектре белков определенной массы.

Сравнение и анализ масс-листов чистых культур штаммов *L. fermentum* 90 TC-4 и референсных штаммов позволили установить, что для штамма *L. fermentum* 90 TC-4 характерен масс-спектр из 85 пиков, 75 из которых хорошо воспроизводимы, а специфичными являются следующие пики: 3373, 4535, 4562, 4638, 4655, 4979, 5051, 5167, 5179.

С использованием масс-спектров рибосомальных белков референсных штам-

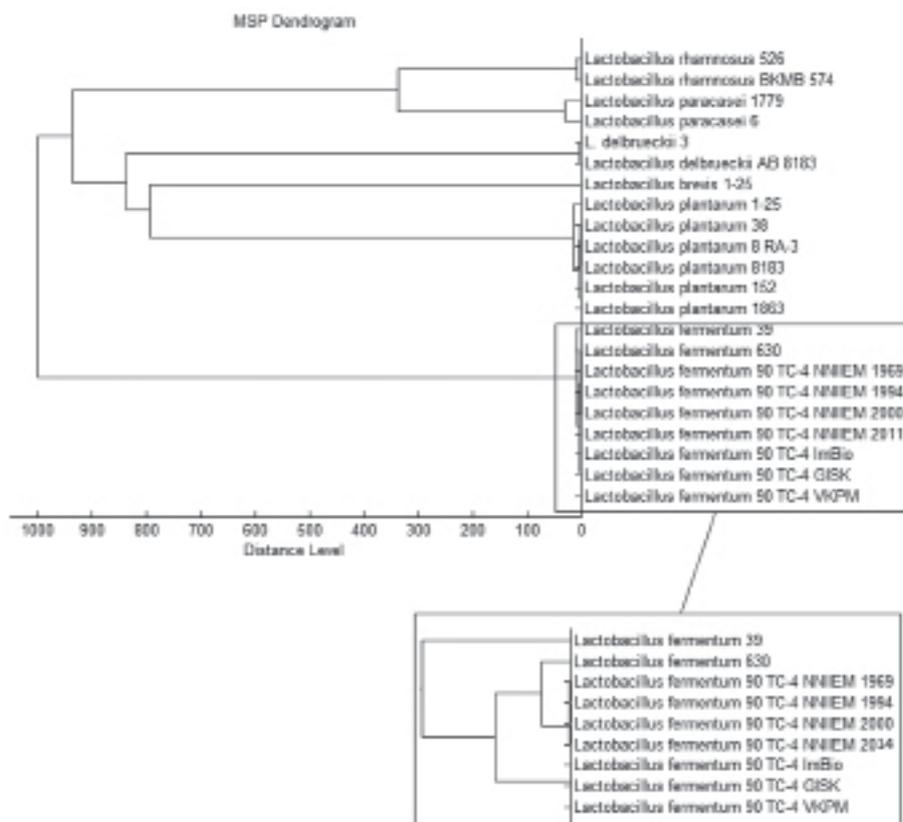


Рис. 2. Расположение штаммов *L. fermentum* 90 TC-4 среди штаммов рода *Lactobacillus* по результатам кластерного анализа MALDI масс-профилей.

мов из коллекции лактобацилл НИИЭМ им. И.Н.Блохиной была построена дендрограмма, иллюстрирующая видовую принадлежность штаммов *L. fermentum* 90 ТС-4 и их положение среди других штаммов рода *Lactobacillus* (рис. 2).

Кластерный анализ масс-профилей позволил отнести исследуемые штаммы в группу, соответствующую виду *L. fermentum*, что еще раз подтверждает его видовую принадлежность. Кроме того, культуры *L. fermentum* 90 ТС-4 из разных коллекций, а также этот штамм, заложенный на хранение в коллекцию НИИЭМ им. И.Н.Блохиной в разные годы (1969, 1994, 2000, 2014), составили единый кластер, что говорит о высокой степени родства данных культур и позволяет отнести их к одному штамму.

Для биохимической идентификации и изучения особенностей биохимического профиля штамма *L. fermentum* 90 ТС-4 было отобрано 10 культур штамма из разных коллекций, прошедших идентификацию с помощью масс-спектрометрии с наиболее высоким значением Score. Была изучена биохимическая активность штаммов с использованием стрипов API 50 CHL, содержащих контроль и 49 субстратов. Установлено, что все исследованные штаммы обладают характерным биохимическим профилем, который соответствует заявленному в паспорте штамма еще в 1969 году [7]: ферментируют галактозу, глюкозу, фруктозу, мальтозу, лактозу, мелибиозу и раффинозу, гидролизуют эскулин и глюконат калия.

Необходимо отметить, что виды *L. fermentum* и *L. plantarum* значительно отличаются по биохимическим свойствам: *L. plantarum* обладает более выраженной метаболической активностью, что обуславливает четкую дифференциацию этих двух видов.

Для дальнейшего изучения таксономического статуса штамма использовали метод ПЦР фрагмента гена 16S рРНК с его последующим секвенированием. Была проведена ПЦР чистых культур штамма с наработкой соответствующих фрагментов, которые затем были сконцентрированы в агарозном геле, выделены с использованием стандартного набора для выделения ДНК из геля. Затем проводилось секвенирование на приборе GenomeLab™ GeXP (Beckman Coulter).

Полученные сиквенсы были проанализированы в программе BLAST. Подтвержден таксономический статус штамма: совпадение нуклеотидных последовательностей указанной детерминанты штаммов *L. fermentum* 90 ТС-4

с наиболее близкой референсной последовательностью из GenBank *L. fermentum* IFO 3956 составило 98%.

С использованием полученных сиквенсов и референсных последовательностей в программе MEGA 6.0 была построена дендрограмма, отражающая их филогенетические связи. В качестве референса использовали последовательности генов 16S рРНК бактерий видов *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus*, находящихся в базе данных GenBank/EMBL. В результате построения иерархической структуры было показано, что все исследуемые варианты штамма входят в состав соответствующего видового кластера, что достоверно подтверждает его таксономическое положение. Необ-

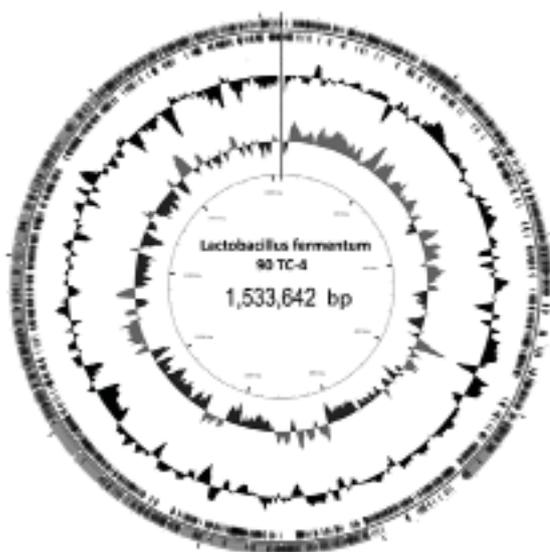


Рис. 3. Геномная карта штамма *L. fermentum* 90 ТС-4, построенная с использованием «CLC bio assembly».

ходимо отметить, что кластер *L. fermentum* далеко отстоит от группы, образованной штаммами вида *plantarum*.

В результате подтверждена идентичность всех исследованных культур *L. fermentum* 90 ТС-4 из вышеперечисленных коллекций с использованием фенотипических (MALDI TOF масс-спектрометрия, биохимическая идентификация) и генетического (секвенирование фрагмента гена 16S рРНК) методов.

На заключительном этапе работы было проведено полногеномное секвенирование штамма *L. fermentum* 90 ТС-4. Построена геномная карта штамма (рис. 3), установлены основные характеристики его генома.

Геном штамма представлен единственной кольцевой хромосомой. Размер генома составляет 1,533,642 пар нуклеотидов, содержание GC — 53,3%, характерное для данного вида [9]. По данным RAST (Rapid Annotation using Subsystems Technology) (<http://rast.nmpdr.org>) наиболее близкие к нашему изоляту штаммы относятся к виду *L. fermentum*: *L. fermentum* IFO 3956, *L. fermentum* 28-3-CHN, *L. fermentum* ATCC 14931, *L. fermentum* CECT 5716.

Полученная геномная последовательность была проанализирована с использованием геномного сервера RAST, в ходе анализа была построена диаграмма, сектора которой соответствовали отдельным кластерам подсистем, представленным в геноме микроорганизма.

Установлено, что в геноме штамма представлено 283 подсистемы, распределенные по 22 крупным кластерам. Генетически детерминированы характерные для рода пути метаболизма углеводов (ферменты гликолиза и пентозофосфатного пути), метаболизма пирувата, моно-, ди- и олигосахаридов, сахароспиртов, механизмы устойчивости к стрессовым воздействиям и др.

В геноме представлены отдельные детерминанты антибиоткорезистентности — бета-лактамазы класса C, гены, детерминирующие устойчивость к тетрациклинам (EF-G — фактор трансляции элонгации G, Tet-like2 — защищающий рибосому протеин группы 2), молекулярные эффлюксные помпы, обуславливающие устойчивость в различных группах антибактериальных препаратов. Подтверждено отсутствие у данного штамма генов, кодирующих трансмиссивную антибиоткорезистентность (*ermC*, *tetO*, *Amp*, *hph*, *sh ble*), установлено, что генетические детерминанты антибиоткорезистентности расположены в геноме штаммов, не сопряжены с мобильными элементами, их горизонтальный перенос маловероятен. Можно рассматривать данный комплекс генов как проявление природной устойчивости данных штаммов к ряду антимикробных препаратов.

Обнаружено 9 детерминант, кодирующих отдельные частицы фагов (phage tail protein), ряд ферментов фага (phage terminase), белков, ответственных за компоновку его частиц. То есть, в геноме штамма содержится фаг в латентном состоянии (профаг), что характерно для большинства прокариот [6].

Показано, что геном штамма *L. fermentum* 90 ТС-4 не содержит детерминант, кодирующих токсины и суперантигены, свободен от генов патогенности (островков патогенности) и интегрированных плазмид.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, проведенный анализ результатов исследования видовой принадлежности штамма *L. fermentum* 90 ТС-4, полученного из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов, из коллекции Научного центра экспертизы средств медицинского назначения, Государственной коллекции лактобацилл НИИЭМ им. И.Н.Блохиной и из рабочей коллекции НПО «Микроген» в г. Нижний Новгород «Нижегородское предприятие по производству бактериальных препаратов «ИмБио» с использованием метода MALDI TOF масс-спектрометрии, классического микробиологического метода, секвенирования участка гена 16S рРНК и полногеномного секвенирования показал, что в пере-

численных коллекциях сохранен искомый штамм, который имеет характерный для данного вида масс-профиль рибосомальных белков и биохимический профиль, соответствующий паспорту штамма.

Выявлено, что в ряде случаев штамм *L. fermentum* 90 ТС-4 загрязнен культурой *L. plantarum*, что и могло послужить причиной «подмены», так как при работе по лиофильному высушиванию и сохранению микроорганизма в коллекции отбирают типичные колонии в S-форме, подобные образуемым штаммом *L. plantarum*, в то время как штамм *L. fermentum* 90 ТС-4 образует колонии R-типа серого цвета, что является его отличительной особенностью.

Полногеномное секвенирование *L. fermentum* 90 ТС-4 позволило установить, что штамм обладает характерным для данного вида содержанием GC-оснований — 53,3 %, показано, что геном штамма содержит нетрансмиссивные гены антибиотикорезистентности, не содержит детерминант, кодирующих токсины и суперантигены, свободен от генов патогенности (островков патогенности) и интегрированных плазмид, что подтверждает возможность использования этого штамма в биотехнологии для производства пробиотиков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ботина С.Г., Лысенко А.М., Суходолец В.В. Выяснение таксономического положения отечественных штаммов термофильных молочнокислых бактерий по данным секвенирования генов 16S рРНК. *Микробиология*. 2005, 74 (4): 448-452.
2. Ботина С.Г., Климина К.М., Коробан Н.В., Амерханова А.М., Зинченко В.В., Даниленко В.Н. Реклассификация отечественных пробиотических культур рода *Lactobacillus*. *Генетика*. 2010, 46 (11): 1485-1492.
3. Ботина С.Г. Молекулярно-биологические подходы к отбору бактериальных культур при создании заквасок для биотехнологии. Автореф. дис. д-ра биол. наук. М., 2011.
4. Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов. МУ № 2.3.2.2789-10. М., Роспотребнадзор, 2010.
5. Методические указания по контролю биологических и микробиологических факторов. Система предрегистрационного доклинического изучения безопасности препаратов. Отбор, проверка и хранение производственных штаммов, используемых при производстве пробиотиков. МУ № 4.2.2602-10. М., Роспотребнадзор, 2011.
6. Равин Н.В., Шестаков С.В. Геном прокариот. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013, 17 (4/2): 972-984.
7. Тарасова Н.Б. Сравнительное изучение лактобактерий и *E.coli* М-17 в целях разработки нового препарата — Лактобактерина. Дисс. д-ра мед. наук. Горький, 1969.
8. Chagnaud P. Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria application to six common *Lactobacillus* species. *J. Microbiol. Meth.* 2001, 44: 139-148.
9. Hammes W.P., Hertel C. The genus of *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. *Procaryotes*. 2006, 4: 320-340.
10. Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al. MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011, 28: 2731-273.

Поступила 30.04.15

Контактная информация: Точилина Анна Георгиевна, к.б.н.,
603950, Нижний Новгород, ул. М. Ямская, 71, р.т. (831) 432-81-86

*М.В.Сычева^{1,4}, А.С.Васильченко^{1,3}, Е.А.Рогожин²,
Т.М.Пашкова¹, Л.П.Попова¹, О.Л.Карташова¹*

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ ТРОМБОЦИТОВ КУР

¹Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург; ²Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова, Москва; ³Оренбургский государственный университет; ⁴Оренбургский государственный аграрный университет

Цель. Выделение и изучение биологической активности антимикробных пептидов из тромбоцитов кур. *Материалы и методы.* В исследовании использовали пептиды из тромбоцитов кур, полученные методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии в ступенчатом и линейном градиентах увеличения концентрации органического растворителя. Их антимикробную активность определяли методом микротитрования в бульоне; механизм биологического действия — с помощью метода флуоресцентной спектроскопии с использованием ДНК-тропных красителей. *Результаты.* Из тромбоцитов кур выделены индивидуальные фракции пептидов, обладающие антимикробной активностью в отношении *Staphylococcus aureus* P209 и *Escherichia coli* K12. Установлено нарушение целостности барьерных структур микроорганизмов под воздействием тромбоцитарных антимикробных пептидов и преобладание клеток с поврежденной мембраной в популяции *E.coli*. *Заключение.* Полученные данные об антимикробной активности и механизме бактерицидного действия впервые выделенных фракций пептидов из тромбоцитов кур расширяют представление о функциональных свойствах тромбоцитов птиц и открывают перспективу для их дальнейшего изучения с целью использования в качестве антимикробного средства.

Журн. микробиол., 2016, № 2, С. 24—29

Ключевые слова: антимикробные пептиды, тромбоциты, тромбоцитарный катионный белок, флуоресцентная спектроскопия, *Staphylococcus aureus* P209, *Escherichia coli* K12

*M.V.Sycheva^{1,4}, A.S.Vasilchenko^{1,3}, E.A.Rogozhin²,
T.M.Pashkova¹, L.P.Popova¹, O.L.Kartashova¹*

BIOLOGICAL ACTIVITY OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM CHICKENS THROMBOCYTES

¹Research Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg; ²Shemyakin and Ovchinnikov Research Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow; ³Orenburg State University; ⁴Orenburg State Agrarian University, Russia

Aim. Isolation and study of biological activity of antimicrobial peptides from chickens thrombocytes. *Materials and methods.* Peptides from chickens thrombocytes, obtained by reverse-phase high-performance liquid chromatography method with stepped and linear gradients of concentration increase of the organic solvent were used in the study. Their antimicrobial activity was determined by microtitration method in broth; mechanism of biological effect — by using fluorescent spectroscopy method with DNA-tropic dyes. *Results.* Individual fractions of peptides were isolated from chickens thrombocytes, that possess antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* P209 and *Escherichia coli* K12. A disruption of integrity of barrier structures of microorganisms under the effect of thrombocyte antimicrobial peptides and predominance of cells with damaged membrane in the population of *E. coli* was established. *Conclusion.* The data obtained on antimicrobial activity and mechanism of bactericidal effect of the peptide fractions from chickens thrombocytes isolated for the first time expand the understanding of functional properties of chickens thrombocytes and open a perspective for their further study with the aim of use as antimicrobial means.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 2, P. 24—29

Key words: antimicrobial peptides, thrombocytes, thrombocyte cationic protein, fluorescent spectroscopy, *Staphylococcus aureus* P209, *Escherichia coli* K12

ВВЕДЕНИЕ

С момента начала эпохи антибиотиков [6] и до настоящего времени одной из первостепенных проблем в терапии инфекционных болезней является появление новых форм микроорганизмов, устойчивых к конвенциональным антибиотикам [1, 3]. В этой связи возникает необходимость поиска новых антимикробных веществ и разработки на их основе препаратов, эффективных в отношении резистентных патогенов. Многие исследования [7, 13] позволяют выделить среди различных природных соединений группу веществ пептидной природы с выраженными антимикробными свойствами. Антимикробные пептиды (АМП) представляют собой низкомолекулярные (менее 10 кДа) преимущественно положительно заряженные (как правило, от +2 до +9) молекулы, синтезируемые широким кругом организмов: от прокариот до высших позвоночных животных [4]. Являясь фактором системы врожденного иммунитета макроорганизма, АМП реализуют свою биологическую функцию, обеспечивая неспецифическую защиту от микробной инвазии. Так, катионные антимикробные пептиды, выделенные из нейтрофилов и тканей эпителиального происхождения (дефензины, протегрины, кателицидины и т. д.), обладают широким спектром действия, оказывая антибактериальное, противовирусное, антипротозойное и антигрибковое действия [9]. Также установлено, что АМП стимулируют продукцию цитокинов, миграцию и пролиферацию клеток [15], модулируют гуморальный иммунный ответ и повышают титр антител после вакцинации [18].

Исследования, посвященные выделению и характеристике АМП животного происхождения, выявили, что клетки крови, в частности тромбоциты, являются источником различных катионных пептидов, обладающих выраженной биологической активностью [17]. Однако основной имеющийся пул данных по этому вопросу посвящен описанию структуры и функции тромбоцитарных антимикробных пептидов (ТАМП) человека [5, 11, 16], в то время как исследования структурно-функциональных свойств ТАМП животных единичны [8].

В этой связи выделение и исследование структурно-функциональных свойств ТАМП сельскохозяйственных животных является актуальным как с точки зрения фундаментальных знаний о межвидовых особенностях биосинтеза тромбоцитарных АМП, так и с точки зрения использования тромбоцитов и кровяных пластинок продуктивных животных в качестве источника антимикробных веществ для создания новых противоинфекционных препаратов.

Цель работы — выделение и изучение биологической активности антимикробных пептидов из тромбоцитов кур.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Тромбоциты получали из цитратной крови клинически здоровых кур-несушек. Обогащенную тромбоцитами плазму отделяли центрифугированием при 250 g в течение 30 минут. Супернатант снова центрифугировали при 1000 g 30 минут. Осажденные тромбоциты отмывали трижды средой 199 (с добавлением 3,8% цитрата натрия в соотношении 1:10). Тромбоцитарную массу ресуспендировали в уксусной кислоте в соотношении 1:10 и выдерживали при -15°C в течение 24 часов. После дефростации полученный экстракт центрифугировали при 1000 g в течение 40 минут. Полученный супернатант использовали для дальнейшего выделения соединений, обладающих антимикробной активностью, методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) в ступенчатом и линейном градиентах увеличения концентрации органического растворителя (ацетонитрил).

На первой стадии была проведена пробоподготовка, включающая в себя высаливание из раствора тотальной белково-пептидной фракции охлажденным ацетоном в соотношении 1:7 (объем/объем) в течение 12 часов при 4°C. На следующий день после центрифугирования (6000 g, 5 мин, 4°C) осадок высушивали на воздухе при периодическом измельчении. Затем полученный ацетоновый осадок перерастворяли в 0,1% трифторуксусной кислоте (ТФУ) и обессоливали методом ОФ-ВЭЖХ на колонке-картридже Aquapore C8 (Applied Biosystems, США), уравновешенную в том же растворителе. После выхода с колонки всех несвязавшихся компонентов элюирование сорбировавшейся фракции осуществляли ступенчатым градиентом (75%) концентрации 80% ацетонитрила в 0,1% ТФУ. Детектирование поглощения вели при длине волны 214 нм. В дальнейшем после упаривания органического растворителя на вакуумной центрифуге (Labconco, США) обессоленный экстракт разделяли методом аналитической ОФ-ВЭЖХ в линейном градиенте увеличения концентрации 80% ацетонитрила в 0,1% ТФУ на колонке Luna C18 4,6x250 мм (Phenomenex, США) с детектированием поглощения при длине волны 214 нм. Собранные фракции лиофилизовали с целью удаления органического растворителя и остаточного количества ТФУ.

Молекулярные массы пептидов измеряли на MALDI времяпролетном масс-спектрофотометре Ultraflex (Bruker Daltonics, Германия), оснащенный УФ-лазером с длиной волны 337 нм в линейном режиме. В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксibenзойную кислоту. На мишени смешивали равные объемы (по 0,7 мкл) образцов и матрицы (15 мг матрицы/мл в 80% CH₃CN, 0,1% ТФУ в воде MQ). Для анализа смесь наносили автоматическим дозатором капельным методом на стальную пластинку-мишень и высушивали на воздухе. Масс-спектры анализировали с помощью программы Bruker DataAnalysis for TOF. Ошибка измерения составляла 0,015%.

Антимикробную активность полученных пептидов определяли методом микротитрования в бульоне [14] по отношению к тест-культурам *Staphylococcus aureus* P209 и *Escherichia coli* K12 с последующим их высевом после соинкубирования в течение двух часов на плотную питательную среду (агар Мюллера-Хинтона). За минимальную бактерицидную концентрацию (МБК) принимали концентрацию пептидов, вызывающую гибель тест-культур.

Для флуоресцентной окраски бактериальных клеток после соинкубирования с антимикробными пептидами из тромбоцитов кур в МБК в течение 1 ч использовали коммерческий набор LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, США). Согласно рекомендациям производителя бактериальные клетки осаждали при 5000 g в течение 5 мин; полученный осадок ресуспендировали в 1 мл дистиллированной воды, после чего доводили оптическую плотность *S. aureus* P209 до 0,1 (OD₆₇₀) и *E. coli* K12 до 0,05 (OD₆₇₀).

Измерение спектров флуоресцентной эмиссии (возбуждение 470 нм, эмиссия 490 — 700 нм) осуществляли на спектрометре Солар СМ 2203 (Республика Беларусь).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате фракционирования уксуснокислого экстракта тромбоцитов кур в гомогенном виде было получено 13 фракций с наиболее высоким поглощением при длине волны 214 нм, которые были протестированы на наличие антимикробной активности в системе *in vitro*. При этом у 8 пептидных фракций с массами в диапазоне от 3,0 до 5,2 кДа зафиксирована выраженная антимикробная активность в отношении *S. aureus* P209 и *E. coli* K12, их минимальные бактерицидные концентрации составляли от 20 до 200 мкг/мл. Фракции №№ 4, 5 и 6 антимикробной активностью не обладали.

В сравнительном аспекте наиболее выраженным антимикробным действием

в отношении *S. aureus* P209 обладали 9, 10 и 13 фракции: двухчасовая инкубация указанных соединений с тест-культурой задерживала рост 99,5; 97,3 и 99% колоний, соответственно. Наиболее активными в отношении *E. coli* K12 оказались пептидные соединения 1 и 10 фракций, снижающие число жизнеспособных клеток в среднем на 95,5% по сравнению с контролем.

Для проведения исследований по изучению механизма биологической активности ТАМП кур в препаративном количестве был получен тотальный обессоленный пептидный экстракт, характеризующий синергидное антимикробное действие тромбоцитарных катионных пептидов, и оценены эффекты его воздействия на *S. aureus* P209 и *E. coli* K12.

Полученные результаты показали, что препарат ТАМП обладает выраженным антимикробным эффектом в отношении тест-культур: через два часа соинкубирования антимикробные пептиды подавляли рост изучаемых бактерий в среднем на 97%.

При этом после соинкубирования ТАМП с *S. aureus* P209 число выросших колоний составило 1800 против $3,7 \times 10^4$ КОЕ/мл в контроле, с *E. coli* K12 — 7400 КОЕ/мл против $1,2 \times 10^6$ КОЕ/мл в контроле.

На следующем этапе работы с помощью метода флуоресцентной спектроскопии был изучен механизм бактерицидного действия ТАМП кур в отношении *S. aureus* P209 и *E. coli* K12.

Использование коммерческого набора для витальной окраски позволило детектировать увеличение проницаемости клеточных мембран микроорганизмов в условиях эксперимента. Внесение в реакционную смесь препарата ТАМП вело к нарушению проницаемости клеточных структур и утрате жизнеспособности значительной части клеточной популяции *E. coli* K12, о чем свидетельствовало существенное увеличение интенсивности флуоресценции в красной области спектра с максимумом при 630 нм, соответствующим эмиссии красителя пропидия иодида, проникающего только через поврежденные клеточные барьерные структуры (рис. 1). В то же время, взаимодействие антимикробных пептидов с *S. aureus* P209 приводило к утрате жизнеспособности лишь некоторой части популяции стафилококка, что фиксировалось как незначительное увеличение интенсивности флуоресценции в красной области спектра (рис. 2).

Таким образом, из тромбоцитов кур выделены индивидуальные фракции пептидов, обладающие антимикробной активностью в отношении *S. aureus* P209 и *E. coli* K12. Изучение особенностей биологического действия ТАМП зафиксировало нарушение целостности барьерных клеточных структур микроорганизмов,

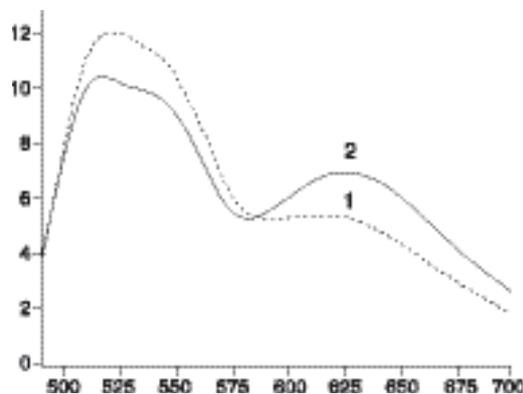


Рис. 1. Спектры флуоресценции бактериальной популяции *E. coli* K12.

Здесь и на рис. 2: 1 — контроль; 2 — опыт; по оси ординат — интенсивность флуоресценции (отн. ед.), по оси абсцисс — длина волны эмиссии флуоресценции (нм).

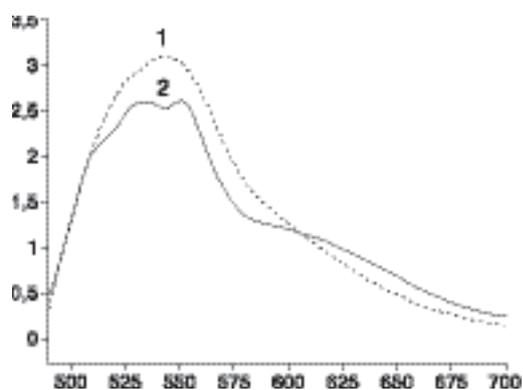


Рис. 2. Спектры флуоресценции бактериальной популяции *S. aureus* P209.

при этом доля бактериальных клеток с поврежденной мембраной преобладала в популяции *E. coli* K12.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее с помощью метода атомно-силовой микроскопии было охарактеризовано биологическое действие кислотных экстрактов из тромбоцитов и кровяных пластинок разных видов сельскохозяйственных животных [12]. При этом было зафиксировано нарушение морфологии грамположительных и грамотрицательных бактериальных клеток при воздействии уксуснокислых экстрактов из тромбоцитов кур. Характер выявленных повреждений позволил предположить наличие в тромбоцитах соединений полипептидной природы, обладающих выраженной антимикробной активностью.

Продолжение работы в этом направлении было связано с очисткой уксуснокислого белково-пептидного экстракта от различных примесей методами жидкостной хроматографии высокого давления. В процессе разделения был получен ряд индивидуальных фракций, восемь из которых продемонстрировали антимикробную активность в отношении использованных тест-культур.

Полученные данные об антимикробных свойствах тромбоцитарных пептидов кур согласуются с исследованиями ряда авторов, указывающих на широкий спектр антимикробного действия катионных пептидов из кровяных пластинок человека и животных [2, 10], и в то же время, являются новыми, впервые описывающими функциональные свойства тромбоцитов птиц.

Изучение особенностей бактерицидного действия тромбоцитарных пептидов кур с помощью метода флуоресцентной спектроскопии позволило, с одной стороны, определить жизнеспособность бактерий при опытном воздействии, с другой — при наличии мембраноповреждающего действия ТАМП зафиксировать это экспериментально.

Основываясь на полученных результатах, можно предположить, что механизм бактерицидного действия реализуется следующим образом: после первичного контакта ТАМП с клеточной стенкой *S. aureus* P209 молекулы пептидов переносятся к их цитоплазматической мембране, а в случае *E. coli* K12 — интегрируются сначала в липополисахаридный слой наружной мембраны, а затем переносятся к внутренней. Результатом подобной интеграции и переноса является нарушение целостности барьерных структур микробных клеток, что и было продемонстрировано посредством флуоресцентной спектроскопии, зафиксировавшей увеличение проницаемости клеточной стенки микроорганизмов. Последнее предположение находит подтверждение в работе Zhu X. et al. [19], которые с помощью флуоресцентной спектроскопии, проточной цитометрии, сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии доказали способность антимикробных пептидов увеличивать проницаемость и нарушать структурную целостность наружной и цитоплазматической мембран бактериальных клеток.

Полученные данные расширяют представление о биологических механизмах антимикробного действия веществ пептидной природы из тромбоцитов кур и являются частью работы по разработке нового перспективного класса антимикробных полифункциональных препаратов, которые могут быть в будущем использованы в медицине и ветеринарии для терапии инфекционно-воспалительных заболеваний.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 14-04-97067 р_поволжье_a).

ЛИТЕРАТУРА

1. Резистентность к противомикробным препаратам: повторение «трагедии общего достояния». Бюллетень ВОЗ. 2010, 88 (11): 805-806.
2. Aktan İ., Dunkel B., Cunningham F.M. Equine platelets inhibit *E. coli* growth and can be

- activated by bacterial lipopolysaccharide and lipoteichoic acid although superoxide anion production does not occur and platelet activation is not associated with enhanced production by neutrophils. *Veterinary Immunol. Immunopathol.* 2013, 152 (3-4): 209-217.
3. Aziz A.-M. The role of healthcare strategies in controlling antibiotic resistance. *British J. Nursing.* 2013, 22 (18): 1066-1074.
 4. Brodgen K.F. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 2005, 3 (3): 238-250.
 5. Dankert J., Krijgsveld J., Van der Werff J. et al. Platelet microbicidal activity is an important defense factor against viridans Streptococcal endocarditis. *J. Infect. Dis.* 2001, 184: 597-605.
 6. Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. Influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* 1929, 10: 226-236.
 7. Forde E., Devocelle M. Pro-moieties of antimicrobial peptide prodrugs. *Molecules.* 2015, 20 (1): 1210-1227.
 8. Ivanov I.B., Gritsenko V.A. Comparative activities of cattle and swine platelet microbicidal proteins. *Probiotics Antimicrob. Proteins.* 2009, 1 (2): 148-151.
 9. Jenssen H., Hamill P., Hancock R.E.W. Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006, 19 (3): 491-511.
 10. Mohan K.V.K., Rao S.S., Gao Y. et al. Enhanced antimicrobial activity of peptide-cocktails against common bacterial contaminants of ex vivo stored platelets. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014, 20 (1): 39-46.
 11. Tang Y.-Q., Yeaman M.R., Selsted M.E. Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect. Immunity.* 2002, 70 (12): 6524-6533.
 12. Vasilchenko A., Dymova V., Kartashova O. et al. Morphofunctional reaction of bacteria treated with antimicrobial peptides derived from farm animal platelets. *Probiotics Antimicrob. Proteins.* 2015, 7 (1): 60-65.
 13. Wang G. Human antimicrobial peptides and proteins. *Pharmaceuticals.* 2014, 7 (5): 545-594.
 14. Wiegand I., Hilpert K., Hancock R.E.W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols.* 2008, 3 (2): 163-175.
 15. Yamasaki K., Gallo R.L. Antimicrobial peptides in human skin disease. *Eur. J. Dermatol.* 2008, 18 (1): 11-21.
 16. Yeaman M.R. Platelets: At the nexus of antimicrobial defence. *Nature Rev. Microbiol.* 2014, 12 (6): 426-437.
 17. Yount N.Y., Gank K.D., Xiong Y.Q. et al. Platelet microbicidal protein 1: Structural themes of a multifunctional antimicrobial peptide. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48 (11): 4395-4404.
 18. Yurong Y., Yibao J., Ruiping S. et al. Effects of chicken intestinal antimicrobial peptides on humoral immunity of chickens and antibody titres after vaccination with infectious bursal disease virus vaccine in chicken. *Archives Animal Nutrition.* 2006, 60 (5): 427-435.
 19. Zhu X., Dong N., Wang Z. et al. Design of imperfectly amphipathic α -helical antimicrobial peptides with enhanced cell selectivity. *Acta Biomaterialia.* 2014, 10 (1): 244-257.

Поступила 10.05.15

Контактная информация: Сычева Мария Викторовна, к.б.н.,
460014, Оренбург, ул. Челюскинцев, 18, р.т. (3532)68-97-13

Ю.А.Тюрин^{1,2}, Р.С.Фассахов¹, Т.В.Григорьева¹, И.Г.Мустафин²

МИКРОБНЫЙ СОСТАВ РАЗЛИЧНЫХ УЧАСТКОВ КОЖИ ПРИ РАЗВИТИИ АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА ПО ДАННЫМ МЕТОДА MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ

¹Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии, ²Казанский государственный медицинский университет

Цель. Изучить трансформацию кожной микрофлоры при развитии атопического дерматита. *Материалы и методы.* Обследованы 45 больных с различными формами атопического дерматита (АтД). Контрольная группа состояла из 26 здоровых лиц. Штаммы культивировали на селективных питательных средах. Идентификацию выделенных штаммов осуществляли методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. *Результаты.* У больных АтД установлены низкая частота встречаемости на коже лица таксона *Staphylococcus epidermidis* и высокая частота встречаемости *Staphylococcus aureus* на коже верхних и нижних конечностей, по сравнению со здоровыми лицами. Частота встречаемости протеолитически активных изолятов *S. aureus* у больных АтД была в 3 раза выше, чем у здоровых носителей этого таксона. У больных АтД на коже нижних конечностей и шеи выявлены таксоны микроорганизмов, не свойственные здоровым лицам, такие как *Bacillus mycoides*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas radiobacter*. Отмечена высокая частота встречаемости грибов *Cryptococcus satoi*, *Candida albicans*, *Malassezia globosa*. *Заключение.* Снижение барьерных функций кожи при АтД способствует контаминации кожи больных редкими бактериальными таксонами и грибами. Одним из возможных механизмов подавления функции иммунокомпетентных клеток могут выступать протеолитические ферменты *S. aureus*.

Журн. микробиол., 2016, № 2, С. 30—36

Ключевые слова: атопический дерматит, MALDI-TOF масс-спектрометрия, *Staphylococcus aureus*, Ig протеолитическая активность

Yu.A.Tyurin^{1,2}, R.S.Fassakhov¹, T.V.Grigorieva¹, I.G.Mustafin²

MICROBIAL COMPOSITION OF VARIOUS SURFACES OF SKIN DURING DEVELOPMENT OF ATOPIC DERMATITIS BASED ON DATA FROM MALDI-TOF MASS-SPECTROMETRY IDENTIFICATION METHOD

¹Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology, ²Kazan State Medical University, Russia

Aim. Study transformation of skin microflora during development of atopic dermatitis. *Materials and methods.* 45 patients with various forms of atopic dermatitis (AtD) were examined. Control group consisted of 26 healthy individuals. The strains were cultivated on elective nutrient media. Identification of the isolated strains was carried out by MALDI-TOF mass-spectrometry method. *Results.* A low frequency of occurrence of taxon *Staphylococcus epidermidis* on face skin and high frequency of occurrence of *Staphylococcus aureus* on upper and lower limb skin was established for AtD patients compared with healthy individuals. The frequency of occurrence of proteolytically active isolates of *S. aureus* in AtD patients was 3 times higher than in healthy carriers of this taxon. Taxons of microorganisms not inherent to healthy individuals such as *Bacillus mycoides*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas radiobacter* were isolated on lower limb and neck skin of AtD patients. A high frequency of occurrence of *Cryptococcus satoi*, *Candida albicans*, *Malassezia globosa* fungi was noted. *Conclusion.* A decrease of barrier functions of skin during AtD facilitates contamination of patients' skin with rare bacterial taxons and fungi. One of the possible mechanisms of suppression of immune competent cell functions could be proteolytic enzymes of *S. aureus*.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 2, P. 30—36

Key words: atopic dermatitis, MALDI-TOF mass-spectrometry, *Staphylococcus aureus*, Ig proteolytic activity

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время возрос интерес к изучению микроорганизмов, заселяющих кожу и слизистые как открытые нестерильные части организма [8]. С современных позиций вся совокупность микроорганизмов, населяющих нестерильные органы, получила названия микробиота, а при использовании современных методов идентификации с секвенированием генома образца, полученного с нестерильных полостей — микробиома, который, по мнению некоторых исследователей, представляет еще один «орган» человека [1].

В физиологических условиях кожа характеризуется полимикробной колонизацией, а при патологии качественный состав микробных сообществ этих тканей претерпевает существенные изменения [7].

Однако данные, касающиеся трансформации полимикробных сообществ кожи и слизистых при развитии аллергических реакций в этих органах, изучены недостаточно.

Цель исследования — изучить трансформацию кожной микрофлоры при развитии атопического дерматита (АтД) и патогенетическую роль отдельных представителей *Staphylococcus spp.*, выступающих как значимый триггерный фактор при этом заболевании.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовали группу 45 больных АтД в возрасте от 3,5 до 16 лет. Контрольная группа состояла из 26 здоровых лиц в возрасте от 4 до 18 лет без патологических изменений кожи и не страдающих аллергической патологией. Забор материала осуществляли ватным тампоном, смоченным стерильным 0,85% раствором хлористого натрия, с пораженных и интактных участков кожи в следующих зонах: лицо, верхние и нижние конечности, область шеи и тела. Смывы в количестве 0,1 мл засеивали на различные селективные питательные среды (5% кровяной агар, ЖСА, МБА, среда Сабуро, селективная среда Notman-агар, Сабуро с хлорамфениколом); культивировали при 37°C и через 36 — 48 ч, а для грибов через 2 — 3 недели; учитывали количество колоний, пересчитывали в КОЕ на 1 см² по методу [2]. Идентификацию таксонов осуществляли методом MALDI-TOF масс-спектрометрии в качестве высоконадежного метода идентификации микроорганизмов, в основе которого лежит сравнение масс-спектра высоко консервативных рибосомальных белков исследуемых микроорганизмов с масс-спектрами, содержащимися в базе данных NCBI [4, 13]. Образцы колоний микроорганизмов, выделенные в чистом виде, ресуспендировали в 15,0 мкл специального раствора (матрицы), 1 мл которой состоит из 475,0 мкл деионизованной воды, 25 мкл 100% трифторуксусной кислоты и 500 мкл ацетонитрила. После подготовки образцы помещали в ячейки мишени (MSP 96 ground steel) масс-спектрометра MALDI Biotyper Systems, серии FLEX™. Каждый образец тестировали в 2 повторах. Снятие спектров проводилось в автоматическом режиме. Всего исследовано 216 таксонов микроорганизмов. Идентификация микроорганизмов проводилась с помощью базы данных Biotyper 3 (Bruker, Германия). Исследование проводили в КПФУ, Институт фундаментальной медицины и биологии. Учет достоверной видовой идентификации принимали по таксонам при Score Value $\geq 2,3$.

Определение IgG протеолитической активности изолятов бактерий *S.aureus* осуществляли иммуноферментным способом [3], который предусматривал предварительное сорбирование в лунках полистиролового планшета полимерных матриц (нуклеиновая кислота), внесение в лунки с полимерной матрицей спе-

цифических к этой матрице IgG и последующее добавление в лунки бесклеточного супернатанта культуральной жидкости, содержащей секретиремые ферменты. Результаты реакции учитывали спектрофотометрически при 492 нм.

Определение действия продуктов культивирования таксонов *S. aureus* на моноциты крови человека осуществляли по способу определения протеолитической модификации клеточных рецепторов, используя в качестве модели мононуклеарные клетки периферической крови человека [5]. Инкубацию выделенных мононуклеаров проводили с бесклеточным супернатантом в разведении 1:1 и 1:2 с буферным раствором 50 мМ Tris-HCl pH 7,4 при 36°C в течение 60 мин. После инкубации клетки отмывали 2-кратно физиологическим раствором и окрашивали с использованием наборов моноклональных антител BD Multitest™ 6-color TBNK и Simultest™ IMK-Lymphocyte Kit. В контроле проводили инкубацию этой же взвеси мононуклеаров со стерильной питательной средой при тех же условиях. Экспрессию рецепторов на мононуклеарных клетках опытных и контрольных проб определяли проточной цитометрией на анализаторе FACSCanto II.

Доверительный интервал (95% ДИ) для частоты встречаемости таксонов рассчитывали по методу Уилсона с поправкой на непрерывность, а достоверность различий между частотами оценивали в открытом статистическом ресурсе Website for Statistical Computation (<http://vassarstats.net/>) с использованием критерия Z. Абсолютный риск встречаемости (EER и CER) условно патогенных таксонов рассчитывали в сравниваемых группах с 95% доверительным интервалом, используя программное обеспечение ресурса <http://medstatistic.ru/index.php>. Достоверность различий между средними величинами определяли в двухвыборочном t-тесте с различными дисперсиями ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Частота встречаемости таксона *S. epidermidis* различна у больных atopическим дерматитом и здоровых лиц. Таксоны микроорганизмов, выделенные от больных и здоровых, по данным MALDI-TOF спектрометрии гомологичны по таким микроорганизмам, как *S. epidermidis* ATCC 14990T THL, *S. epidermidis* DSM 1798 DSM. Выявлены достоверные различия в частоте встречаемости на коже лица таксона *S. epidermidis* между здоровыми и больными ($z=2,25$, $p=0,024$). Таксон *S. epidermidis* свойственен здоровой коже лица, частота выявления 47,0% (38,2 — 57,4), у больных он встречался реже — в 18% (16,6 — 42,7). Что касается кожи верхних конечностей, нижних конечностей, области шеи и тела, то существенных различий в частоте встречаемости таксона *S. epidermidis* не установлено. Достаточно распространен этот таксон на коже тела как у больных, так и здоровых лиц: 50,0% (35,7 — 64,3) и 45,0% (32,6 — 51,5) соответственно. На коже конечностей частота встречаемости этого таксона в группах больных и здоровых лиц была меньше, чем на коже тела, и составила от 34% (23,9 — 44,2) до 38,0% (29,3 — 44,7) без существенных различий между группами больных и здоровых лиц.

Частота встречаемости таксона *S. aureus* у здоровых лиц и больных АтД на всех зонах тела существенно различалась. Таксоны, выделенные от больных и здоровых лиц, были гомологичны по таким таксонам, как *S. aureus* ATCC33591 THL, *S. aureus* ATCC29213 THL, *S. aureus* spp. aureus DSM 4910 DSM, *S. aureus* ATCC33862 THL, *S. aureus* spp. aureus DSM 3463 DSM. На коже лица у больных АтД частота обнаружение *S. aureus* составила 68,0% (53,4 — 73,2), у здоровых лиц — 7,3% (5,8 — 8,5), $p < 0,0002$, $z=7,7$. На коже тела у больных АтД частота этого таксона составила 25,0% (14,5 — 41,6), а у здоровых 11,5% (5,4 — 23,5), $z=1,9$, $p < 0,05$. Выявлена очень высокая встречаемость *S. aureus* у больных АтД на коже верхних и нижних конечностей — 90,0% (84,9 — 98,5) и 92,0% (97,8 — 100,0) соответственно, тогда как у здоровых лиц кожа этих областей тела колонизировалась золоти-

стым стафилококком значительно реже с частотой 12,5% (7,5 — 21,7) и 4,2% (1,5 — 8,9), $p < 0,0002$, $z = 9,1$, $z = 10,6$.

Коринебактерии кожи в составе кожной микрофлоры у больных АтД были представлены такими таксонами, как *Corynebacterium propinquum*, *Propionibacterium asnes*. Выявлены существенные различия в частоте встречаемости у больных таких таксонов, как *C. propinquum* на коже лица и верхних конечностей. Этот вид у больных встречался достоверно реже и составил от 4,0% (1,0 — 13,9) до 10,0% (7,8 — 15,7) на коже лица и верхних конечностей, а на коже нижних конечностей, шеи и тела данный таксон у больных не выявляли. *P. asnes* у больных встречался достоверно реже на лице с частотой не более 6,0% (1,5 — 17,5), а у здоровых частота этого таксона на коже лица составила 18,7% (11,7 — 28,2), на других зонах кожи данный вид не выявлен.

У здоровых лиц на коже лица и верхних конечностей частота встречаемости *C. propinquum* была наибольшей и составила 46,8% (36,7 — 57,3) и 50,0% (39,6 — 60,0) соответственно. Встречаемость у здоровых лиц этого таксона на коже нижних конечностей, шеи и тела была меньше и составила 38,5% (28,9 — 49,0), 12,5% (7,0 — 21,2) и 9,4% (4,6 — 17,5) соответственно. На коже лица здоровых добровольцев установлен еще один таксон — *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, который встречался в 33,3% (23,3 — 42,7) случаев. Этот таксон редко встречался у больных АтД — только на коже лица (6,0%, 1,5 — 17,5).

Редкие таксоны (транзиторная или случайная микрофлора), выявленные на коже больных и здоровых лиц, относились к представителям факультативно-анаэробных спорообразующих грамположительных палочек, таких как *Bacillus*. У больных АтД на коже нижних конечностей и шеи выявлен вид *Bacillus mycoides* в 4,0% (0,7 — 14,8) и в 2,0% (0,1 — 12,0) случаев, этот вид у здоровых лиц выявлен только на коже шеи в 2,0% (0,4 — 8,0) случаев. Редко выявляли на коже лица у здоровых лиц *B. pseudomycoides* — в 1,0% (0,05 — 6,5). У здоровых лиц представителей рода *Streptomyces* не выявляли, тогда как у больных АтД таксон *Streptomyces badius* выявлен в 8,0% (2,5 — 20,1) случаев.

Из споронеобразующих грамотрицательные палочек на коже больных и здоровых лиц выявляли несколько видов бактерий, относящихся к семейству *Lactobacillaceae*. Распространенность их на коже здоровых лиц была больше, чем на кожных покровах больных АтД. У больных на коже нижних конечностей идентифицированы *L. vitulinus* и *L. paracasei* spp. *paracasei*, их встречаемость составила 8,0% (2,6 — 20,1) и 4,0% (0,7 — 15,0) соответственно. У здоровых лиц на коже лица, верхних и нижних конечностей идентифицированы 5 видов этих бактерий. Частота встречаемости этих видов у здоровых лиц составила для *L. casei* 7,3% (3,2 — 14,9), *L. vitulinus* — 3,1% (0,8 — 9,5), *L. amylovorum* — 3,1% (0,8 — 9,5), *L. paracasei* spp. *paracasei* — 4,2% (1,3 — 11,0), *L. oligofermentas* — 10,4% (5,4 — 18,7).

Аэробные грамотрицательные кокки, в частности, представители семейства *Pseudomonas*, у здоровых лиц на коже не встречались. У больных АтД с кожи верхних и нижних конечностей идентифицированы такие виды, как *Pseudomonas putida* — в 6,0% (1,6 — 17,5) и *Pseudomonas radiobacter* в 14,0% (6,3 — 27,4) случаев. У здоровых лиц с кожи лица и шеи были идентифицированы бактерии, относящиеся к роду *Neisseria*, в частности, таксон *Neisseria flavescens* с частотой 7,3% (3,2 — 14,9) и 3,1% (0,8 — 9,5) соответственно. Таким образом, у больных АтД возрастает риск контаминации кожи представителями таких видов, как *P. putida* и *P. radiobacter*, которые не встречались на коже у здоровых лиц.

Различные таксоны грибов идентифицировали на различных участках кожи как у здоровых, так и больных АтД. В основном были представлены таксоны грибов, относящиеся к родам *Cryptococcus*, *Candida*, *Malassezia*. У больных АтД встречаемость таксона *Cryptococcus satoii* на коже нижних конечностей составила 12,0% (4,9 — 25,0), а у здоровых лиц данный вид выделялся только с кожных по-

кровов шейной области в 1,0% (0,05 — 6,4). Вид *Candida albicans* у больных АтД был идентифицирован с кожи верхних конечностей в 24,0% (13,5 — 38,4), а у здоровых лиц — в 5,1% (1,9 — 12,3). Частота встречаемости этого вида на коже верхних конечностей была достоверно выше у больных АтД, чем в группе контроля ($z=3,4$, $p<0,001$). Представители *Malassezia caprae*, *Malassezia globosa* идентифицированы на коже всех зон у здоровых лиц, а также у больных АтД. У больных АтД *M. caprae* встречался на коже лица и верхних конечностей с частотой 10,0% (3,7 — 22,6) и 6,0% (1,5 — 17,5) соответственно. У здоровых лиц этот вид был идентифицирован в 2,0% (0,3 — 8,0) на коже лица, в 5,2% (1,9 — 12,3) случаев на коже верхних конечностей и в 9,4% (4,6 — 17,5) случаев на коже тела. Частота встречаемости *M. globosa* была выше у больных АтД, чем у здоровых лиц. У больных АтД этот вид выделялся с кожи верхних и нижних конечностей с частотой 20,0% (10,5 — 34,1) и 24,0% (13,5 — 38,5) соответственно. У здоровых лиц *M. globosa* выделяли только с кожи нижних конечностей в 1,0% (0,05 — 6,5).

Применение высокочувствительных методов определения протеолитической активности показало достоверное различие по частоте встречаемости штаммов-продуцентов протеолитических ферментов среди изолятов *S. aureus*, выделенных с кожи больных и здоровых лиц ($z=7,5$, $p<0,0002$). При исследовании 120 изолятов *S. aureus*, выделенных с различных зон кожи больных, протеолитически активными были 107 (89,1%, 95% ДИ, 81,8 — 93,8) штаммов, а при тестировании 36 изолятов *S. aureus* с различных зон кожи у здоровых носителей протеолитически активными были только 10 (27,7%, 95% ДИ, 14,8 — 45,4) штаммов. Таким образом, установлен факт, играющий важную роль в патогенезе АтД: частота встречаемости *S. aureus*, являющихся продуцентами протеолитических ферментов, способных расщеплять такие защитные факторы, как иммуноглобулины человека и другие протеины кожи, у больных с различными формами АтД в 3 раза превышала показатель у не страдающих АтД носителей этого таксона.

При инкубации бесклеточных супернатантов, полученных при культивировании кожных изолятов *S. aureus*, выделенных от пациентов с атопическим дерматитом, с мононуклеарами периферической крови наблюдали достоверное снижение экспрессии CD14 в опытных образцах, по сравнению с контролем (табл.). Установлено, что субстратами протеолитических ферментов штаммов *S. aureus* могут быть также и гликопротеины (CD14 рецепторы).

Экспрессия кластеров дифференцировки CD14 на мононуклеарах крови человека после инкубации с бесклеточными супернатантами штаммов *S. aureus*, выделенных с кожи

| Штаммы | 1 эксперимент | | 2 эксперимент | |
|-----------------------------|--|-----------------------------|--|-----------------------------|
| | Активность (супернатант+ Tris HCl буфер, pH 7.4) (1:1), Усл. ед. | Экспрессия кластера CD14, % | Активность (супернатант+ Tris HCl буфер, pH 7.4) (1:2), Усл. ед. | Экспрессия кластера CD14, % |
| Протеазоактивные | | | | |
| <i>S. aureus</i> №5 | 0,61±0,05x10 ⁻⁵ | 70,0±3,0 | 0,3±0,05x10 ⁻⁵ | 40,0±2,7 ^a |
| <i>S. aureus</i> №34 | 0,68±0,05x10 ⁻⁵ | 65,0±5,0 | 0,3±0,05x10 ⁻⁵ | 31,5±3,1 ^b |
| <i>S. aureus</i> №6 | 0,72±0,05x10 ⁻⁵ | 56,0±4,0 | 0,32±0,05x10 ⁻⁵ | 33,0±3,0 ^c |
| <i>S. aureus</i> №19 | 0,75±0,05x10 ⁻⁵ | 80,0±5,0 | 0,31±0,05x10 ⁻⁵ | 43,0±3,5 ^d |
| Протеазонеактивные | | | | |
| <i>S. aureus</i> №43 | 0 | 96,7±0,6* | 0 | 95,8±0,7** |
| <i>S. aureus</i> №44 | 0 | 98,6±0,7* | 0 | 97,5±0,8** |
| <i>S. aureus</i> №28 | 0 | 95,8±0,6* | 0 | 96,7±0,7** |
| Контроль отрицательный (К-) | 0 | 98,3±0,7* | 0 | 99,2±0,8** |

Примечание. К- стерильная питательная среда, МПБ; * различия достоверны по сравнению с протеазоактивными штаммами, $p<0,05$, $t=2,4$ в 1 эксперименте; ** различия достоверны по сравнению с протеазоактивными штаммами и отрицательным контролем во 2 эксперименте, $p<0,05$, $t=2,4$; ^{a,b,c,d} различия между экспрессией CD14 в 1 эксперименте и 2 эксперименте достоверны, $p<0,01$, $t=2,45$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таксон *S. epidermidis* имеет существенное значение в защите от патогенных бактерий, является нормальным комменсалом кожи человека [11], выявляется на здоровой коже лица, а при развитии атопического дерматита частота выявления его на коже лица снижается.

Наиболее патогенный вид — *S. aureus* является распространенным микроорганизмом, по данным литературы до 20 — 30% здоровых людей являются бессимптомными носителями данного вида бактерий, который преимущественно колонизирует преддверие и слизистую носа, но может встречаться и на коже [10, 14]. У больных АД выявлена высокая частота идентификации данного таксона на коже лица, верхних и нижних конечностей. Абсолютный риск в основной группе (EER) колонизации кожи данным таксоном при АД для кожи лица составил 0,9, в контрольной группе (CER) — 0,25 при чувствительности (Se) 0,68 и специфичности (Sp) 0,93. Для кожи верхних конечностей EER был равен 0,88 и CER 0,1, при Se 0,9 и Sp 0,89. Для кожи нижних конечностей EER был равен 0,89 и CER 0,08 при Se 0,9 и Sp 0,89. Для кожи шейной области EER был равен 0,85 и CER 0,24 при Se 0,72 и Sp 0,87.

Таким образом, можно констатировать, что патогенный таксон *S. aureus* является своего рода маркерным таксоном у больных АД. Особенностью штаммов *S. aureus*, выделяемых с кожи больных АД, в отличие от штаммов, колонизирующих кожу у здоровых носителей, является способность продуцировать протеолитические ферменты. Установлена субстратная специфичность секретируемых стафилококковых ферментов в отношении Ig, а также способность воздействовать на клеточные рецепторы лимфоцитов, у которых внеклеточная область молекулы состоит из иммуноглобулиноподобных доменов (белки, относящиеся по классификации к CD4, CD8, CD16) [6]. Протеолитические ферменты *S. aureus* способны воздействовать на другие гликопротеины, в частности, на CD14 рецепторы, локализованные на моноцитах и макрофагах. Данные рецепторы представляют собой гликопротеины (55 кДа) и являются дифференцировочным антигеном зрелых моноцитов крови, обеспечивают взаимодействие клеток с пептидогликанами (PGN) клеточных стенок грамположительных бактерий, активируют один из механизмов активации клеток макрофагального ряда. Протеолитическая модификация стафилококковыми ферментами данного рецептора на клетках моноцитарного ряда может подавлять реакции как адаптивного, так и врожденного иммунитета кожи, направленные на вирусные, бактериальные микроорганизмы и опухолевые клетки.

Установлено, что представители коринебактерий, в частности *P. acnes*, гидролизуют триглицериды липидов кожи, способствуя образованию свободных жирных кислот, которые выполняют целый ряд протективных функций [12]. Obligатные комменсалы кожи *Corynebacterium* spp. и *S. epidermidis* подавляют рост наиболее патогенного таксона *S. aureus* и внедрение его в дерму, предотвращают колонизацию этим патогеном сальных желез [9]. При развитии АД на коже лица, шеи, и некоторых областей тела, где наблюдается большая плотность сальных желез, отмечено снижение колонизации таксонов *Corynebacterium* spp., а также уменьшение числа видов и встречаемости бактерий, относящихся к семейству *Lactobacillaceae*, что снижает защитные свойства кожи. Этому способствует также изменение функции сальных желез при атопическом дерматите.

Снижение защитных свойств кожной микрофлоры и барьерных свойств кожи при АД способствует контаминации кожи больных такими не свойственными здоровой коже редкими бактериальными таксонами, как *B. mycoides*, *S. badius*, *P. putida*, *P. radiobacter*.

Доминирующая колонизация кожи *S. aureus* у больных атопическим дерматитом, штаммы которого посредством протеолитических ферментов подавляют функцию иммунокомпетентных клеток, приводит к увеличению колонизации

кожи условно патогенными грибами, такими как *S. satoi*, *S. albicans*, *M. globosa*, которые встречаются на коже конечностей у больных атопическим дерматитом достоверно чаще, чем у здоровых лиц.

Благодарности: к.б.н. Тойменцовой А.А.и к.м.н. Баязитовой Л.Т.

ЛИТЕРАТУРА

1. Власов В.В. Микробный «орган» человека. Наука из первых рук. 2014, 1 (55): 33.
2. Иванова Н. А., Данилова Е.Г. Количественное исследование микрофлоры здоровой кожи. Вестник дерматологии и венерологии. 1984, 2: 59-61.
3. Куликов С.Н., Долбин Д.А., Тюрин Ю.А., Хайруллин Р.М., Фассахов Р.С. Высокочувствительный способ определения иммуноглобулин-протеиназной активности с использованием полимерных матриц. Патент РФ № 2519071. Бюл. № 16, 2014.
4. Маянский Н.А., Калакуцкая А.Н., Мотузова О.В. и др. MALDI-TOF масс-спектрометрия в рутинной работе микробиологической лаборатории. Вопросы диагностики в педиатрии. 2011, 3 (5) :20-25.
5. Тюрин Ю.А., Мустафин И.Г., Фассахов Р.С. Способ определения протеолитической модификации клеточных рецепторов на модели выделенных лимфоцитов периферической крови. Патент РФ № 2510026. Бюл. № 8, 2014.
6. Тюрин Ю.А., Мустафин И.Г., Фассахов Р.С. Действие супернатантов штаммов *Staphylococcus aureus* на поверхностные рецепторы лимфоцитов человека. Бюл. эксп. биологии и медицины. 2012, 154 (12): 733-736.
7. Baker B. S. The role of microorganisms in atopic dermatitis. Clin. Exp. Immunol. 2006, 144: 1-9.
8. Chiller K, Selkin B. A., Murakawa G. J. Skin microflora and bacterial infections of the skin. J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. 2001, 6 (3):170-174.
9. Cogen A. L., Yamasaki K., Sanchez K.M. et al. Selective antimicrobial action is provided by phenol-soluble modulins derived from *Staphylococcus epidermidis*, a normal resident of the skin. J. Invest. Dermatol. 2010, 130 (1): 192-200.
10. Frank D. N., Feazel L. M., Bessesen M. T. et al. The human nasal microbiota and *Staphylococcus aureus* carriage. PLoS One. 2010, 17; 5 (5): e10598.
11. Iwase T., Uehara Y., Shinji H. et al. *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. Nature. 2010, 20; 465 (7296): 346-349.
12. Marples R. R., Downing D. T., Kligman A. M. Control of free fatty acids in human surface lipids by *Corynebacterium acnes*. J. Invest. Dermatol. 1971, 56 (2): 127-131.
13. Murray P. R. What is new in clinical microbiology-microbial identification by MALDI-TOF mass spectrometry: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on molecular pathology. J. Mol. Diagn. 2012, 14 (5): 419-423.
14. Wertheim H. F., Melles D. C., Vos M. C. et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. Lancet Infect. Dis. 2005, 5 (12): 751-762.

Поступила 20.07.15

Контактная информация: Тюрин Юрий Александрович, к.м.н.,
420015, Казань, ул. Б. Красная, 67, р.т. (843)238-99-79

*Е.С.Довгополюк¹, Л.В.Пузырева², А.Д.Сафонов², А.В.Мордык²,
А.Т.Тюменцев¹, Л.И.Левахина¹, Г.А.Калачева¹*

ЭПИДЕМИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО ВИЧ-ИНФЕКЦИИ В СИБИРСКОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ В 2014 ГОДУ

¹Омский НИИ природно-очаговых инфекций, Сибирский федеральный окружной центр по профилактике и борьбе со СПИД, Омск; ²Омский государственный медицинский университет

Цель. Проанализировать основные эпидемиологические показатели по ВИЧ-инфекции на территории СФО за период с 2012 по 2014 гг. с выделением вклада регионов в эпидемию для разработки персонализированной окружной программы по сдерживанию дальнейшего распространения ВИЧ. *Материалы и методы.* Были использованы сведения основных статистических форм и ежемесячных отчетных данных всех регионов, расположенных на территории округа. *Результаты.* В целом как на изучаемой территории, так и в некоторых регионах выявлена тенденция к росту заболеваемости ВИЧ-инфекцией с преимущественным парентеральным путем передачи. ВИЧ-инфекция наиболее часто продолжает выявляться среди молодого, трудоспособного населения. Ежегодно увеличивается количество впервые выявленных больных в стадии СПИД, и отмечен рост летальности среди ВИЧ-инфицированных больных. *Заключение.* Указаны прогностические данные на следующий год.

Журн. микробиол., 2016, № 2, С. 37—41

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, Сибирский федеральный округ, заболеваемость ВИЧ, пораженность, прогноз

*E.S.Dovgopolyuk¹, L.V.Puzyreva², A.D.Safonov², A.V.Mordyk²,
A.T.Tyumentsev¹, L.I.Levakhina¹, G.A.Kalacheva¹*

EPIDEMIC SITUATION FOR HIV-INFECTION IN SIBERIAN FEDERAL REGION IN 2014

¹Omsk Research Institute of Natural-Foci Infections, Siberian Federal Regional Centre of Prophylaxis and Control of AIDS, Omsk; ²Omsk State Medical University, Russia

Aim. Analyze main epidemiologic indicators for HIV-infection on the territory of SFR for the period from 2012 to 2014 with allotment of contributions of regions into the epidemic for development of personalized regional program for further containment of HIV spread. *Materials and methods.* Data of main statistical forms and monthly reports of all the regions situated on the territory of the district were used. *Results.* At large, on both the studied territory and some regions a tendency of growth of HIV-infection morbidity with predominant parenteral transmission was detected. HIV-infection continues to be detected most frequently in young able-bodied population. The number of patients detected for the first time at AIDS stage increases annually, and an increase of lethality among HIV-infected was noted. *Conclusion.* Prognostic data for the next year are indicated.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 2, P. 37—41

Key words: HIV-infection, Siberian Federal Region, HIV morbidity, prevalence, prognosis

ВВЕДЕНИЕ

Проблеме ВИЧ-инфекции в мире и в Российской Федерации сегодня уделяется первостепенное значение ввиду ее высокой распространенности и темпов прироста первичной заболеваемости [3, 12]. Однако даже в целом по России не все регионы одинаково затронуты эпидемией. На территории Сибирского федерального округа (СФО) существуют территории, где каждый десятый взрослый гражданин инфицирован ВИЧ (пример — Иркутская область), есть регионы, не-

давно вступившие в эпидемию (Омская область) [8, 9], и в течение нескольких лет живущие в ее зоне (Новосибирская область, Кемеровский край) [6]. Задачей настоящего времени является сдерживание эпидемии, последствия которой не предсказуемы и, в первую очередь, представляют реальную угрозу для социально-экономического развития страны, что связано с пораженностью вирусом лиц молодого и среднего возраста, составляющих основной трудовой и репродуктивный потенциал [1, 6]. Эпидемия ВИЧ-инфекции/СПИД в России затрагивает не только группы высокого риска, но и широкие слои населения [1], так как теперь заражаются не столько потребители инъекционных наркотиков, но ежегодно увеличивается число случаев заражения в результате незащищенных половых контактов и детей путем вертикальной передачи [4, 6, 11, 14].

Существующая в России система эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией дает свои положительные результаты, но в настоящее время нуждается в оптимизации и адаптации к изменяющейся ситуации, так как дальнейший прогноз развития эпидемии ВИЧ-инфекции неутешителен [2, 13]. Неравномерное территориальное распространение ВИЧ-инфекции в России может быть обусловлено географическими и социально-экономическими факторами [5, 7], но требует оценки для реализации качественных профилактических программ с целью сдерживания эпидемии среди населения.

Цель — проанализировать основные эпидемиологические показатели по ВИЧ-инфекции на территории СФО за период с 2012 по 2014 гг. с выделением вклада регионов в эпидемию для разработки персонализированной окружной программы по сдерживанию дальнейшего распространения ВИЧ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы сведения: ежемесячной отчетной формы по реализации в сфере здравоохранения «Сведения о мероприятиях по профилактике ВИЧ-инфекции, гепатитов В и С, выявлению и лечению больных ВИЧ»; статистической формы № 4 «Сведения о результатах исследования крови на антитела к ВИЧ»; экспресс-информации «Об эпидемической ситуации по ВИЧ-инфекции»; данных программы «АСОДОС» (списки выявленных ВИЧ-инфицированных); статистической формы № 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях»; статистической формы № 9 «Сведения о заболеваниях инфекциями, передаваемыми половым путем и заразными кожными заболеваниями»; статистической формы № 61 «Сведения о контингентах больных ВИЧ-инфекцией»; справки специализированной научно-исследовательской лаборатории по профилактике и борьбе со СПИД Центрального НИИ эпидемиологии (Федеральный научно-методический центр по профилактике и борьбе со СПИД) по эпидемиологической ситуации по ВИЧ-инфекции в РФ.

В статье упоминаются коды выявления ВИЧ-инфекции, используемые при дотестовом консультировании. Код 102 — внутривенное введение наркотиков, 103 — гомо- и бисексуалы, 104 — больные инфекциями, передающимися половым путем, 108 — доноры (крови, биологических материалов, органов, тканей), 109 — беременные, 112 — лица, находящиеся в местах лишения свободы, 113 — лица, обследованные по клиническим показаниям, 115 — медицинский персонал, работающий с ВИЧ-больными, 120 — лица, обследованные при эпидемиологическом расследовании, 200 — иностранные граждане, 118 — прочие (добровольно, анонимно, аварийные ситуации, призывники, ВВК, случайные связи) [9].

Полученные данные обработаны с помощью программного средства Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Заболеваемость ВИЧ-инфекцией на территории РФ за 3-летний период (с 2012 по 2014 гг.) увеличилась с 40,8 до 58,4 случаев на 100 тыс. населения. По СФО этот показатель вырос с 96,0 до 135,7 на 100 тыс. Темп прироста заболеваемости по РФ за исследуемый период составил 43,14%, по СФО — 41,35%.

Общее число выявленных случаев ВИЧ на 01.01.2015 г. достигло 183 309 человек, показатель пораженности населения составил 948,4 на 100 тыс. населения против 816,3 в 2013 г. К настоящему времени установлено, что более 0,8% населения СФО инфицировано ВИЧ. Наибольшая доля ВИЧ-инфицированных лиц среди населения зарегистрирована в Иркутской области — 1,8%, Кемеровской области — 1,6%, Новосибирской области — 0,9%.

В округе продолжается увеличение количества ВИЧ-инфицированных как среди взрослого, так и детского населения. Среди зарегистрированных в 2014 г. пациентов доля лиц, выявленных на стадии СПИД, оказалась выше в 1,4 раза, чем в 2013 году, составила 4,4%, в т. ч. отмечено увеличение выявленных на стадии СПИД детей.

Заболеваемость ВИЧ-инфекцией в регионах СФО не одинакова. Так, наиболее низкие показатели наблюдались в Республике Тыва — 6,4 на 100 тыс. населения в 2014 г. Относительно умеренные показатели заболеваемости ВИЧ-инфекцией в СФО, по сравнению с другими регионами, в 2014 г. наблюдались в Республике Хакасия (23,2 на 100 тыс. населения), Забайкальском крае (34,2 на 100 тыс.), Республике Алтай (42,5 на 100 тыс.) и Республике Бурятия (57,2 на 100 тыс. населения). Наиболее высокие показатели заболеваемости ВИЧ-инфекцией в течение трех лет остаются в Томской и Кемеровских областях (в 2014 г. 162,0 и 238,3 на 100 тыс. соответственно).

Число вновь выявленных ВИЧ-инфицированных в 2014 г. составило 26 171 человек, что на 3082 больше, чем в 2013 г. Наибольшую долю (22,9%) среди вновь выявленных ВИЧ-инфицированных составили лица, освидетельствованные по коду 118 (прочие), далее обследованные по клиническим показаниям в лечебно-профилактических учреждениях (код 113) — 22,3% и выявленные из группы потребителей инъекционных наркотиков (код 102) — 18,7%. Кроме того, отмечен рост доли выявленных ВИЧ-инфицированных из группы риска (код 102, 103, 104, 112) с 35,2% в 2013 г. до 36,0% в 2014 г.

Среди впервые выявленных лиц с ВИЧ-инфекцией в СФО в 2014 г. преобладали лица мужского пола — 62,2%, женщины составили 37,6%. Соотношение ВИЧ-позитивных мужчин и женщин составило 1,7 : 1. В 2013 г. доля мужчин составляла 61,1%, соотношение было прежним. За 3-летний период исследования доминирует парентеральный путь передачи ВИЧ-инфекции, на долю которого приходилось более половины всех случаев заражения. В разрезе контингентов ВИЧ (кодов) наибольшая доля парентерального заражения отмечена среди потребителей инъекционных наркотиков (код 102) и заключенных (код 112) — 98,0 и 87,4%, соответственно. При этом, 42,2% лиц по коду 118 и 41,0% лиц по коду 113, заразившихся парентеральным путем, после проведения эпидемиологического расследования и составления итоговых (годовых отчетов) не учтены в коде 102.

Тенденция к увеличению доли полового пути заражения в текущем году сохраняется. Так, если доля полового пути в 2012 г. составляла 45,2%, в 2013 г. — 44,4%, то в 2014 г. она достигла 45,3%.

Увеличение доли полового пути передачи вируса подтверждается и ростом уровня заболеваемости ВИЧ-инфекцией среди выявленных беременных с 724,4 случаев на 100 тыс. соответствующего контингента в 2012 г., 997,6 в 2013 г. до 1085,2 — в 2014 г. Установлено, что уровень заболеваемости беременных более 1,0% свидетельствует о генерализованной стадии эпидемии. В 2014 г. в СФО этот уровень превысил 1,1%.

На протяжении нескольких лет доля заразившихся ВИЧ-инфекцией при гомосексуальных контактах оставалась невысокой и стабильной — 0,2%, однако в 2014 г. отмечен ее рост до 0,8%.

В возрастной структуре ВИЧ-инфицированных в 2014 г. по сравнению с двумя предыдущими годами изменений не выявлено, по-прежнему, наибольшее число ВИЧ-позитивных лиц составляют возрастные группы 30 — 34 года — 26,4%, 25 — 29 лет — 22,0%, 35 — 39 лет — 19,9%, 20 — 24 года — 9,6%.

В 2014 г. проведен анализ среди случаев ВИЧ-инфекции по сроку заболевания

(давности). Установлено, что лица, выявленные в 2014 г., были инфицированы 2 года назад в 24,1% случаев; в течение 1 года — в 21,2%; 6 и более лет назад — в 9,4% случаев.

В 2014 г. от ВИЧ-инфекции умерли 5305 человек, что на 567 человек больше, чем в 2013 г. и на 1216 больше, чем в 2012 г. Показатель годовой летальности ВИЧ-инфицированных составил 20,3% против 16,1 и 15,2% в прошлые годы, соответственно. Общее число умерших с начала эпидемии составило 30 608 человек, в том числе детей от 0 до 14 лет — 112 человек. Кумулятивная летальность составила 16,7%.

При прогнозировании эпидемической ситуации по ВИЧ-инфекции в СФО с 2010 по 2014 гг. выявлена выраженная тенденция к росту заболеваемости (темпа роста составляет 15,5%), уровень заболеваемости прогнозируется в доверительном интервале от 147,8 до 149,6 на 100 тыс. населения.

Таким образом, в Сибирском федеральном округе сохраняется тенденция к росту заболеваемости ВИЧ-инфекцией, которая в 2014 г. составила 135,7 на 100 тысяч населения. Парентеральный путь передачи ВИЧ-инфекции остается основным, на его долю приходится 53,5%. Половой путь передачи вскоре начнет конкурировать с парентеральным. Среди ВИЧ-инфицированных лиц преобладают мужчины, а в возрастной структуре более половины пациентов имеют возраст от 25 до 39 лет (68,3%). Суммарная доля выявленных с ВИЧ-инфекцией лиц из контингентов по кодам 102, 103, 104, 112 увеличилась. Также, увеличился удельный вес пациентов, выявленных в стадии СПИД. Ежегодно увеличивается количество умерших среди ВИЧ-инфицированных лиц. В дальнейшем в СФО прогнозируется тенденция к росту заболеваемости ВИЧ-инфекцией и увеличению числа умерших.

ЛИТЕРАТУРА

1. Богач В.В., Троценко О.Е. Особенности распространения ВИЧ-инфекции в Дальневосточном федеральном округе. Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2002, (1): 12-14.
2. Верещагин Д.И., Пасечник О.А. Эффективность применения информационных технологий в системе профилактики социально-значимых заболеваний. Врач-аспирант. 2015, 68 (1): 154-158.
3. Виноградова Т.Н., Рахманова А.Г., Леонова О.Н. и др. ВИЧ-инфекция в Санкт-Петербурге. Казанский медицинский журнал. 2011, 92 (2): 269-272.
4. Довгополюк Е.С., Калачева Г.А., Мордык А.В. и др. Эпидемиология туберкулеза у детей с перинатальным контактом по ВИЧ-инфекции в Сибирском федеральном округе. Сибирское медицинское обозрение. 2011, 72 (6): 47-50.
5. Зайцева Н.Н., Ефимов Е.И., Альтова Е.Е. и др. ВИЧ-инфекция в Приволжском федеральном округе. Медицинский альманах. 2010, 3: 124-126.
6. Калачева Г.А., Довгополюк Е.С., Мордык А.В. и др. Эпидемиологическая ситуация сочетанной патологии ВИЧ-инфекции, туберкулеза и наркомании в Сибирском федеральном округе. Сибирское медицинское обозрение. 2011, 72 (6): 40-44.
7. Кожевников А.А., Яковлев П.Н., Кочеткова В.П. и др. Эпидемиологическая ситуация по ВИЧ/СПИД-инфекции на территории Республики Саха (Якутия). Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2003, 3: 22-24.
8. Мордык А.В., Пузырева Л.В., Ситникова С.В. и др. Туберкулез в сочетании с ВИЧ-инфекцией на территории Омской области за период с 2008 по 2012 гг. ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2014, 6 (2): 106-109.
9. Мордык А.В., Ситникова С.В., Пузырева Л.В. и др. Эпидемическая ситуация по туберкулезу и ВИЧ-инфекции в Омской области с 1996 по 2013 гг. Медицинский альманах. Эпидемиология. 2014, 32 (2): 62-64.
10. О проведении исследования на ВИЧ-инфекцию: метод рекомендации от 6 августа 2007. № 5950-РХ. Министерство здравоохранения и социального развития Российской Федерации. КонсультантПлюс : справ.-правовая система. Режим доступа : <http://www.consultant.ru/>.

11. Покровский В.В. ВИЧ-инфекция и СПИД: национальное руководство. М., 2013.
12. Покровский В.В., Ладная Н.Н., Буравцова Е.В. ВИЧ-инфекция. Информационный бюллетень. М., 2010.
13. Покровский В.В., Юрин О.Г., Беляева В.В. и др. Клиническая диагностика и лечение ВИЧ-инфекции. М., 2001.
14. Рахманова А.Г., Виноградова Е.Н., Воронин Е.Е. и др. ВИЧ-инфекция. СПб, 2004.

Поступила 12.06.05

Контактная информация: Пузырева Лариса Владимировна, к.м.н.,
644050, Омск, ул. Химиков, 8А, р.т. (3812) 40-45-20

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

О.В.Дуванова, Б.Н.Мишанькин, А.С.Водопьянов, В.М.Сорокин

N-АЦЕТИЛ- β -D-ГЛЮКОЗАМИНИДАЗА ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

Ростовский-на-Дону противочумный институт

Цель. Изучить N-ацетил- β -D-глюкозаминидазу (хитобиазу) (ЕС 3.2.1.30) у штаммов холерных вибрионов O1/неO1серогрупп различного происхождения, являющуюся составной частью хитинолитического комплекса с учетом объекта выделения и эпидемиологической значимости штаммов. *Материалы и методы.* Культуры штаммов *Vibrio cholerae* O1/неO1серогрупп получены из музея живых культур Ростовского НИПЧИ. Анализ ферментативной активности проведен на флюоресцентном спектрофотометре Hitachi F-2500 с использованием лицензионного программного обеспечения FL Solutions. При характеристике фермента привлекали базы данных NCBI. *Результаты.* Обнаружена, очищена колоночной хроматографией, изучена и охарактеризована по ряду физико-химических и биологических свойств N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза у штаммов *Vibrio cholerae* O1/неO1серогрупп. Сравнительный компьютерный анализ аминокислотной последовательности N-ацетил- β -D-глюкозаминидаз холерного вибриона (ген VC2217), *Serratia marcescens* и др. позволил отнести фермент из *V.cholerae* к гликозилгидролазам (хитобиазам) семейства 20 и классифицировать согласно номенклатуре ферментов как КФ 3.2.1.30. *Заключение.* Впервые изучена и охарактеризована N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза у холерных вибрионов O1/неO1серогрупп различного происхождения и эпидемиологической значимости, участвующая в утилизации хитина, а также показана ее возможная роль в биологии возбудителя холеры.

Журн. микробиол., № 2, С. 41—48

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, штаммы, N-ацетил- β -D-глюкозаминидазная активность, 4-метилумбеллиферил-N-ацетил- β -глюкозаминид (4-MUF-GlcNAc)

О.В.Дуванова, Б.Н.Мишанькин, А.С.Водопьянов, В.М.Сорокин

N-ACETYL- β -D-GLUCOSAMINIDASE OF *VIBRIO CHOLERAЕ*

Rostov-on-Don Research Institute for Plague Control, Russia

Aim. Study N-acetyl- β -D-glucosaminidase (chitobiase) (EC 3.2.1.30) in strains of *Vibrio cholerae* of O1/non-O1 serogroups of various origin, that is a component of chitinolytic complex taking into account object of isolation and epidemiologic significance of strains. *Materials and methods.* Cultures of *V.cholerae* O1/non-O1 serogroup strains were obtained from the museum of live culture of Rostov RIPC. Enzymatic activity analysis was carried out in Hitachi F-2500 fluorescent spectrophotometer using FL Solutions licensed software. NCBI databases were used during enzyme characteristics. *Results.* N-acetyl- β -D-glucosaminidase in *V.cholerae* O1/non-O1 serogroup strains was detected, purified by column chromatography, studied and characterized by a number of physical-chemical and biological properties. Comparative computer analysis of

amino acid sequence of N-acetyl- β -D-glucosaminidases of *V.cholerae* (VC2217 gene), *Serratia marcescens* etc. has allowed to attribute the enzyme from *V.cholerae* to glycosyl-hydrolases (chitobias) of family 20 and classify it according to enzyme nomenclature as EC 3.2.1.30. **Conclusion.** N-acetyl- β -D-glucosaminidase in *V.cholerae* of O1/non-O1 serogroups of various origin and epidemiologic significance, participating in chitin utilization was studied and characterized for the first time, and its possible role in biology of cholera causative agent was shown.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 2, P. 41—48

Key words: *Vibrio cholerae*, strains, N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity, 4-methylumbelliferone-N-acetyl- β -D-glucosaminide (4-MUF. GlcNAc)

ВВЕДЕНИЕ

Возбудитель холеры даже в наше время продолжает представлять серьезную угрозу для здоровья человека. Особенности географического расположения России, глобализация и усиление интеграционных процессов с разными странами, интенсификация миграционных потоков населения являются предпосылками для возможного заноса холеры в Российскую Федерацию из стран с эндемичными очагами.

Учитывая ведущую роль водного фактора в распространении холеры, можно полагать, что продолжительность сохранения и свойства холерных вибрионов, включая их генотип, во многом зависят от состояния физико-химических и гидробиологических показателей воды открытых водоемов, качественной структуры и количественного содержания в них фито- и зоопланктона, факторов, определяющих особенности конкретной экосистемы. Для вибрионов характерна высокая адаптационная пластичность, которая связана с их жизненным циклом, с одной стороны, и функционированием мощного ферментативного хитинолитического комплекса — с другой [2]. В деградации хитина принимают участие, по крайней мере, шесть белков (три хитиназы, глюкозамин-связывающий белок, дезацетилаза олигосахаридов хитина, спиндолин-подобный хитин-связывающий белок) с использованием системы секреции второго типа и N-ацетилглюкозаминидазы, которая к настоящему времени у холерного вибриона не изучена и данные о ней носят предположительный характер, так как заимствованы из работ с использованием *Vibrio harvey*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio vulnificus* и *Vibrio parahaemolyticus*. Тем не менее, сведения о ферменте могут оказаться полезными для выяснения механизма его действия, возможного участия в биологии и экологии холерных вибрионов.

Цель работы — изучить N-ацетил- β -D-глюкозаминидазу (хитобиазу) (EC 3.2.1.30) у штаммов холерных вибрионов O1/неO1 серогрупп, являющуюся составной частью хитинолитического комплекса с учетом объекта выделения и эпидемиологической значимости штаммов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В зависимости от решаемой в работе задачи использовали разные группы штаммов: 6 штаммов *V. cholerae* O1 классического (ctx+ tcp+); 6 дефектных по синтезу токсина и токсинорегулируемых пилей штаммов *V. cholerae* O1 эльтор (Δ ctx Δ tcp), выделенных из воды поверхностных водоемов; 12 штаммов *V. cholerae* O139 серогруппы, из которых 6 (ctx+ tcp+) были выделены из клинического материала, а 6 атоксигенных (Δ ctx Δ tcp) — из проб воды поверхностных водоемов; 6 штаммов *V. cholerae* non O1/nonO139 (ctx+ tcp+, Δ ctx tcp+, Δ ctx Δ tcp), выделенных из клинического материала; 6 атоксигенных

(Δ ctx Δ tcp) — из органов рыб, выловленных в акватории Азовского моря. Штамм P-5879 биовара эльтор (ctx+ tcp+) использовали в качестве положительного контроля, штамм *Escherichia coli* QD5003 — в качестве отрицательного при определении N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы. Штаммы получали из музея живых культур Ростовского НИПЧИ, где их хранили в лиофилизированном состоянии. Для культивирования микроорганизмов использовали агар Мартена (pH 7,6), Хоттингера (pH 7,2) и эритрит-агар (pH 7,2). Ферментативную активность у холерных вибрионов выявляли качественно [7] и количественно с применением флуорогенного субстрата 4-метилумбеллиферил-N-ацетил- β -D-глюкозаминида (4-MUF. GlcNAc, Serva). Результат реакции оценивали на флюоресцентном спектрофотометре Hitachi F-2500 с использованием лицензионной программы FL Solutions. Измерение флюоресценции опытной пробы относительно контроля (4-MUF. GlcNAc) проводили в кювете из кварцевого стекла объемом 1 см при эмиссии 495 и экстинкции 365 нм. Количество (мкг) образовавшегося 4-метилумбеллиферона в результате отщепления от субстрата (4-MUF. GlcNAc) находили по калибровочной кривой, которую строили с использованием коммерческого препарата — 4-метилумбеллиферона (Serva). Активность выражали в мкг метилумбеллиферона/10⁹ м.к./мл/час, отщепленного от субстрата 4-MUF. GlcNAc клетками холерного вибриона за 1 час инкубации при 37 или 28°C. Антимикробную активность очищенного препарата N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы исследовали в отношении штаммов ряда гетерологичных микроорганизмов: *Micrococcus luteus*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia pestis* EV, *Escherichia coli* HB101 и *E.coli* QD5003. Для этого на поверхность чашек с агаром Хоттингера (pH 7,2) и эритрит-агаром засеивали 10⁹ микробных клеток по стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича и после распределения культуры шпателем устанавливали металлические колодцы диаметром 5 мм, в которые вносили испытуемый образец препарата в концентрации 0,05 — 0,7 мкг белка на пробу. Учет результатов проводили на 2 — 3 сутки роста при 37°C.

Для выделения и очистки фермента выращенные в течение 24 часов на агаре Мартена при 37°C и смытые физиологическим раствором клетки штамма *V. cholerae* eltor O1 18950 (Δ ctx Δ tcp) осаждали центрифугированием на холоде при 6000 об/мин. Клетки разрушали механическим растиранием с песком, и после удаления детрита (10000 об/мин) лизаты центрифугировали при 105 000 x g 1 час при 4°C (ротатор Sorvall AH 627, центрифуга модели Beckman L5-50B). Надосадочную жидкость концентрировали в 2 — 4 раза ультрафильтрацией (камера 10 PA, мембрана PM 30) в системе Amicon. Полученный концентрат использовали для выделения и очистки N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы с помощью гель-фильтрации через колонку с сефадексом G-100 (37x2 см) (Whatman, Англия), уравновешанную 0,01 М ацетатным буфером pH 6,0. Активные фракции объединяли и хроматографировали на фрактогеле TSK DEAE-650 (21x2 см) (Merk). Белок элюировали 0,2 М раствором NaCl, от которого избавлялись последующим диализом. Фракции собирали по 5 мл и проверяли на ферментативную активность, используя в качестве субстрата 4-метилумбеллиферил-N-ацетил- β -D-глюкозаминид (4-MUF. GlcNAc, Sigma). Белок определяли по методу Лоури или с использованием флюориметра Qubit TM фирмы Invitrogen (США).

Сыворотку получали четырехкратной внутримышечной иммунизацией кроликов по 0,05 мг белка в неполном адьюванте Фрейнда (Calbiochem) с двухнедельными интервалами.

Наличие гена N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы у вибрионов тестировали в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с помощью сконструированных праймеров: For:GGTTAACCATAAAGCGCTGAAC; Rev:TTGACCATCCAGTGAGTATTGC, размер фрагмента составил 193 п.н. Отжиг праймеров проводили при 60°C, предварительная денатурация — при 94°C 2 минуты, 40 циклов 94°C — 20 секунд, 60°C — 20 секунд, 72°C — 20 секунд и заключительная элонгация при 72°C — 2 минуты. Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами [1] с использованием t-критерия Стьюдента и программы Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Известно, что большая группа генов, непосредственно участвующих в реминерализации хитина, образует так называемый хитинолитический комплекс. Часть генов этого комплекса мы охарактеризовали с помощью ПЦР с использованием оригинальных праймеров (это гены хитиназы, GlcNAc — связывающего белка, хитодекстриназы, хитопорина, хитинчувствительной гистидинкиназы и хитин-регулируемых пилей) [2], кроме одного гена VCA0140 (хитинсвязывающий белок), праймеры к которому взяты из [3]. Все штаммы O1 и O139 серогрупп клинического происхождения несли полный набор изучаемых генов хитиназного комплекса. Однако довольно пестрая картина результатов в ПЦР была выявлена у вибрионов водного происхождения. И хотя у всех исследованных водных штаммов *V. cholerae* O139 отсутствовали гены VC1073 (хитиназа), VC1952 (внеклеточная хитиназа, ChiA1), VCA0811 (GlcNAc-связывающий белок, glpA), VC0972 (хитопорин), VC2324 (ChiRP-хитин-регулируемые пилы, ген PilA), тем не менее, это не отразилось на ПЦР-детекции N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы, которая у них регистрировалась довольно четко.

Прежде чем приступить к выделению и характеристике N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы, был проведен биоинформационный анализ. Поиск в GenBank показал, что в нем содержится информация о трех β-гексозаминидазах (гликозилгидролазах, К.Ф.3.2.1.52), находящихся на первой хромосоме холерного вибриона. Они наделены разным молекулярным весом, зарядом, принадлежат к разным семействам гликозилгидролаз, что указывает на их индивидуальность. Выяснено, что ген VC 2217 из штамма *V.cholerae* El Tor 16961, детерминировал белок из 883 аминокислотных остатков мол. массой 97,9 кДа. Продукт этого гена является гликозилгидролазой семейства 20, а домен 2 проявлял сходство на 57,2% с геном NghA, кодирующим N-ацетил-β-D-глюкозаминидазу *Yersinia pseudotuberculosis* 1123.

Среди различных модельных систем важное место занимает *Serratia marcescens*, у которой осуществлено клонирование и секвенирование гена chb (N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы). Тщательно проведенные исследования позволили Tews I. et al. [8] выявить в белке структурно-функциональные домены, широко используемые другими исследователями при анализе свойств и идентификации вновь выделяемых белков. Фермент является мономером, состоит из 885 аминокислотных остатков, имеет мол. массу около 98,1 кДа и лидерную последовательность из 27 аминокислот.

При сравнительном компьютерном анализе аминокислотных последовательностей N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы *S. marcescens* и продукта гена VC2217 оказалось, что совпадение между ними составляет 54% и сходство 12,65%. Такая высокая степень близости (66, 65%) белков двух бактерий позволила идентифицировать у фермента из холерного вибриона активный центр

из двух консервативных аминокислот Asp₅₃₉ и Glu₅₄₀. Обнаружены также консервативные для β-N-глюкозаминидаз остатки Asp₃₄₆, Arg₃₄₉, Asp₃₇₈, Asp₃₇₉, Trp₆₁₆, Trp₆₈₅ и Trp₇₃₇, участвующие в связывании субстрата в фермент-субстратном комплексе. Белок гена VC2217 — гликопротеин с тремя сайтами гликозилирования. Высокая степень сходства ферментов из *Serratia marcescens* и холерного вибриона проявилась и при изучении их структурных доменов. Выполненный биоинформационный анализ позволил заключить, что продукт гена VC2217 является N-ацетил-β-D-глюкозаминидазой (КФ 3.2.1.30), участвующей в гидролизе хитина, и определил направление наших усилий по ее выделению, очистке и изучению некоторых свойств.

Одна из задач состояла в обнаружении фермента у холерных вибрионов, выделенных из различных источников с разным генотипом. В результате проведенного исследования установлено, что у всех штаммов *V. cholerae* O1 классического и эльтор биоваров, *V. cholerae* O139, non O1/nonO139, выделенных из различных источников и с разным набором детерминант вирулентности (ctx+ tcp+, Δctx tcp⁺, ΔctxΔtcp), N-ацетил-β-D-глюкозаминидазная активность была четко зарегистрирована как качественным, так и количественным методами. Это позволило не только обнаружить фермент у всех штаммов, но и продемонстрировать вариабельность уровня N-ацетил-β-D-глюкозаминидазной активности у штаммов в зависимости от объекта выделения и набора детерминант вирулентности. Обнаружено, что условия выращивания (температура) и индивидуальные особенности штаммов вибрионов влияли на уровень активности N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы. Так, клетки, выращенные на агаре Мартена при 28°C, обладали более высокой активностью по сравнению с выращенными при 37°C. Выявленное увеличение активности N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы при понижении температуры культивирования у штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп, изолированных из воды, позволило предположить участие этого фермента в выживаемости/сохраняемости холерных вибрионов во внешней среде в условиях возможного контакта с хитинсодержащими объектами. Полученные данные могут указывать на эволюционно сложившуюся важность этого энзима для вибрионов различного происхождения. Клетки штаммов *V. cholerae* O1 эльтор биовара и O139 серогруппы (ΔctxΔtcp), выделенные из объектов окружающей среды (вода поверхностных водоемов) и выращенные на агаре Мартена при 28°C, обладали большей N-ацетил-β-D-глюкозаминидазной активностью по сравнению со штаммами, выращенными при 37°C. Для штаммов *V. cholerae* O1, выращенных при 28°C, она составила в среднем 5,99±0,65 мкг 4-метилумбеллиферона/10⁹ м.к./мл/час, а для штаммов *V. cholerae* O139 серогруппы — 7,76±5,14 мкг 4-метилумбеллиферона/10⁹ м.к./мл/час. В условиях культивирования при 37°C ферментативная активность для эльтор вибрионов (ΔctxΔtcp) составила в среднем — 3,57±0,92 мкг 4-метилумбеллиферона/10⁹ м.к./мл/час и для штаммов *V. cholerae* O139 — 4,75±2,73 мкг 4-метилумбеллиферона/10⁹ м.к./мл/час соответственно (при p=0,05). Исключение составили штаммы P-16072 (ctx+ tcp+) и P-17781 (ΔctxΔtcp), у которых отличий обнаружено не было, возможно, из-за индивидуальных особенностей штаммов. Подобная тенденция отсутствовала у штаммов вибрионов классического биовара (ctx+ tcp+), активность которых составила в среднем 7,81±3,22 при выращивании в условиях 28°C и 8,92±3,10 мкг 4-метилумбеллиферона/10⁹ м.к./мл/час — при 37°C соответственно, что может свидетельствовать о большей экологической пластичности штаммов *V. cholerae* O1 эльтор и O139 серогрупп в условиях водного биоценоза. Интересно отметить, что у штаммов *V. cholerae* O139 (ctx+ tcp+), изолированных из кли-

нического материала и выращенных в условиях 28°C, было обнаружено увеличение ферментативной активности, что можно рассматривать как выработанный адаптационный механизм низкотемпературной регуляции метаболизма, направленный на реализацию стратегии выживания вибрионов в новых экологических условиях.

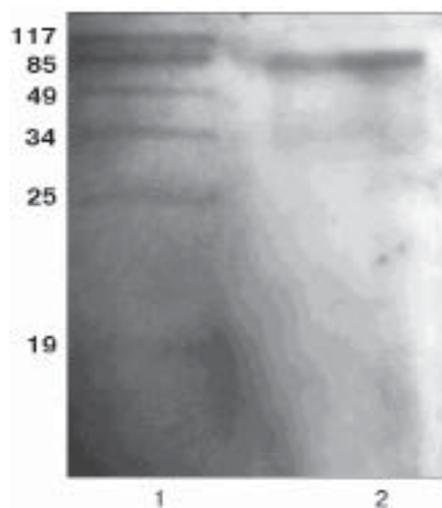
Не менее интересным объектом оказалась группа штаммов *V. cholerae* non O1/non O139, часто выделяемых на различных территориях Российской Федерации. N-ацетил-β-D-глюкозаминидазная активность четко проявлялась у всех исследованных штаммов холерных вибрионов не O1/ не O139 серогрупп, выделенных из различных источников с разным набором детерминант вирулентности (ctx+ tcp+, Δctx Δtcp, Δctx tcp+), а также у штаммов Δctx tcp+ из клинического материала и содержащих профаг preCTX. В ходе анализа полученных результатов выявлено, что активность N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы у штаммов *V. cholerae* non O1/non O139 из органов рыб, выловленных в акватории Азовского моря, составила в среднем 4,39±0,53 мкг метилумбеллиферона/10⁹ м.к./мл/час. Данные были близки показателям этой активности у водных штаммов *V. cholerae* O139 серогруппы. Однако активность N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы у штаммов *V. cholerae* non O1/non O139, выделенных от людей, оказалась выше и составила в среднем 19,7±7,35 мкг метилумбеллиферона/10⁹ м.к./мл/час (при p=0,05), что подчеркивает важность изучения роли этого фермента в биологии штаммов клинического происхождения.

Несмотря на нестабильность, N-ацетил-β-D-глюкозаминидазу удалось очистить в 4 раза с удельной активностью 53 мкг метилумбеллиферона/мг белка (табл.), что позволило охарактеризовать его некоторые физико-химические свойства. Согласно данным гель-электрофореза в 10% ПААГ геле (рис.), молекулярная масса очищенного мономера находилась в пределах 85 — 117 кДа, что было близко расчетным данным компьютерного анализа (97,9 кДа). При контакте с раствором субстрата 4-метилумбеллиферил-N-ацетил-β-D-глюкозаминида регистрировали интенсивную флюоресценцию геля в районе расположения полосы фермента.

Оптимальным для действия фермента оказался рН, равный 6,0 и температура 37°C, однако прогревание энзима в течение 15 мин при 50°C сопровождалось снижением его активности на 78%. При определении чувствительности фермента к действию реагентов различной химической природы выявлено ингибирующее действие ионов цинка, марганца, меди и же-

Очистка N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы из клеток штамма *V. cholerae* 18950

| Этап очистки | Белок, мг/мл | Удельная активность, мкг метилумбеллиферона/мг белка |
|---|--------------|--|
| Клеточный экстракт | 2,6 | 16,0 |
| Фракция после центрифугирования при 105 000 g | 1,6 | 44,25 |
| Гель-фильтрация через сефадекс G-100 | 1,3 | 51,67 |
| Хроматография на TSK-DEAE 650 | 0,5 | 53,0 |



Результаты гель-электрофореза в 10% ПААГ-SDS препарата очищенного белка N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы (лунка 2) холерного вибриона. В лунке 1 — маркеры молекулярных масс.

леза. Присутствие в пробе ЭДТА и SDS (1 мМ) значительно снижало активность фермента. Вещества, нарушающие конформацию молекулы белка (8М мочевины и азид Na), вызывали полную инактивацию фермента. В концентрациях 0,05 — 0,1 М NaCl активировал ферментативную активность на 20%, а в концентрации 2 М подавлял на 45%. Активность N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы ингибировалась на 50% после 15-минутной инкубации препарата с 1,5 мМ (250 мкг/мл) ацетилцистеина. Концентрация в 0,36 — 0,75 мМ подавляла активность на 25 — 30%, тогда как большая концентрация препарата (3 мМ и выше) полностью ингибировала активность фермента, что объясняется наличием в структуре его каталитического домена четырех остатков цистеина.

Константа Михаэлиса-Ментен (K_m) составила 0,03 мкМ, а V_{max} — 0,316 мкМ. При изучении субстратной специфичности очищенного препарата фермента использовали субстраты 4-метилумбеллиферил-β-D-глюкопиранозид, 4-метилумбеллиферил-Nацетил-β-D-глюкозаминид, 4-метилумбеллиферил-β-D-галактопиранозид. Активность была обнаружена только в отношении 4-MUF. GlcNAc, хотя на разных этапах очистки в пробах четко регистрировалась галактозидазная активность, что может указывать на присутствие β-N-гексозаминазы (КФ 3.2.1.52, ген VC0613). В результате очистки удалось получить препарат с активностью только N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы. Полученная к ферменту кроличья антисыворотка образовывала линии преципитации с исходным препаратом фермента.

Анализ полученных результатов показал, что испытуемый препарат обладал антибактериальным действием, подавляя в низких концентрациях рост ряда лабораторных штаммов *E. coli* HB101, *E. coli* QD5003, *M. luteus*, *S. typhimurium*, *Y. pestis* EV. Диаметр зон ингибирования роста был различным (3 — 10 мм), максимально выраженный антибактериальный эффект проявлялся в отношении *M. luteus* и *S. typhimurium*. Можно полагать, что препарат N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы может быть активен в отношении и других микроорганизмов.

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования у холерных вибрионов O1/неO1 серогрупп различного происхождения независимо от набора детерминант патогенности обнаружена, изучена и охарактеризована N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза (хитобиаза), являющаяся составной частью хитинолитического комплекса. Наиболее высокую активность при этом наблюдали у штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп с генотипом Δctx Δtcr из объектов окружающей среды при культивировании в условиях 28°C. Полученные результаты могут указывать на значимость этого фермента для выживания и сохранения холерных вибрионов в объектах окружающей среды как в воде поверхностных водоемов, так и в морской рыбе в условиях контакта с хитинсодержащими объектами. У выделенных от людей штаммов *V. cholerae* non O1/non O139, O1 классического биовара в условиях выращивания при 37°C наблюдали тенденцию к повышению активности фермента. Отдельно стоит вопрос о причинах неодинаковой активности у штаммов различного происхождения, которые могут быть связаны с особенностями регуляции синтеза или активности фермента, что предполагает необходимость изучения особенностей структуры генов и прилегающих к ним промотерных областей.

Выявленная антибактериальная способность фермента представляет интерес, так как перекликается с предположением Kaplan J.V. et al. [6] о возмож-

ном участии, например, N-ацетилглюкозаминидазы из *Actinobacillus actinomycesetemcomitans* в качестве фактора колонизации в явлении устранения биопленок других бактерий с целью освобождения поверхности для собственного укоренения в конкретной экологической нише. Найденное можно рассматривать в качестве материальной основы конкурентных возможностей холерных вибрионов в сложных механизмах их циркуляции в разнообразных природных условиях.

Проведен сравнительный компьютерный анализ аминокислотной последовательности N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы холерного вибриона (ген VC2217), *S. marcescens* и др., который вместе с другими характеристиками позволил отнести фермент из *V. cholerae* к гликозилгидролазам (хитобиазам) семейства 20 и классифицировать согласно номенклатуре ферментов как КФ 3.2.1.30. Проведенное исследование позволило дополнить хитинолитический комплекс холерного вибриона N-ацетил- β -D-глюкозаминидазой, ферментом, играющим важную роль в сохранении, выживании, питании возбудителя во внешней среде. Полученные данные могут найти применение в прикладных и фундаментальных работах по изучению тонких механизмов колонизации кишечника, сохранения и формирования новых форм вибрионов в окружающей среде, лучше адаптированных в различных экологических нишах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л., Медицинская литература, 1962.
2. Мишанькин Б.Н., Шиманюк Н.Я., Водопьянов С.О., Романова Л.В., Водопьянов А.С., Дуванова О.В., Атарова Г.Т., Демьяненко С.В. Изучение хитинолитического комплекса холерного вибриона сероварианта O139. Биотехнология. 2010, 1: 32-40.
3. Bhowmick R., Ghosal A., Chatterjee N. S. Effect of environmental factors on expression and activity of chitinase genes of vibrios with special reference to *Vibrio cholerae*. J. Appl. Microbiol. 2007, 103: 97-108.
4. Henrissat B., Bairoch A. New families in the classification of glycosyl hydrolase based on amino acid sequence similarities. Biochem. J. 1993, 293:781-788.
5. Hunt D.E., Gevers D., Vahora N.M., Polz M.F. Conservation of the chitin utilization pathway in the Vibrionaceae. Appl. Environ. Microbiol. 2008, 74 (1): 44-51.
6. Kaplan J.B., Rangunath C., Ramasubbu N., Fine D.H. Detachment of *Actinobacillus actinomycesetemcomitans* biofilm cells by an endogenous β -hexosaminidase activity. J. Bacteriol. 2003, 185 (16): 4693-4698.
7. O'Brien M., Colwell R. A rapid test for chitinase activity that uses 4-methylumbelliferyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide. Appl. Environ. Microbiol. 1987, 53 (7): 1718-1720.
8. Tews I., Vincentelli R., Vorgias C. N-acetylglucosaminidase (chitinase) from *Serratia marcescens*: gene sequence, and protein production and purification in *Escherichia coli*. Gene. 1996, 170: 63-67.

Поступила 10.08.15

Контактная информация: Дуванова Ольга Викторовна, к.б.н.,
344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького 117/40, р.т. (863)240-22-66

МЕХАНИЗМЫ АТТЕНУАЦИИ ХОЛОДОАДАптиРОВАННОГО ШТАММА А/КРАСНОДАР/101/35/59 (H2N2)

НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

Цель. Изучение механизмов аттенуации холодоадаптированного (ХА) штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) вируса гриппа, связанных с нарушением функций белка NS1. *Материалы и методы.* Проведено изучение интерферогенной активности ХА штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2), его родительского варианта А/Краснодар/101/59 (H2N2), вирулентного штамма А/WSN/33 (H1N1) и ряда одногенных и полигенных реассортантов между данными штаммами, полученных с помощью обратной генетики. Изучение динамики экспрессии гена ИФН β проводили с использованием методического подхода ОТ-ПЦР в режиме реального времени. *Результаты.* Было показано, что включение в состав генома вирулентного штамма А/WSN/33 (H1N1) PB1-гена ХА штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) с реверсией к дикому типу не приводит к резкому изменению интерферогенной активности реассортанта. В то же время, аналогичное включение PB1-гена ХА штамма приводила к запредельному росту интерферогенной активности реассортанта. С другой стороны, включение в состав генома вирулентного штамма А/WSN/33 NP-гена дикого штамма А/Краснодар/101/59 (H2N2) не отличалось по эффекту на интерферогенность реассортанта от включения NP-гена ХА штамма. *Заключение.* На формирование аттенуационного фенотипа реассортантов могут влиять как констелляция генов родительских вариантов, так и мутации, локализованных в этих генах. Полученные результаты позволяют предположить возможные механизмы аттенуации ХА штамма, связанных с нарушением функции NS гена.

Журн. микробиол., 2016, № 2, С. 49—56

Ключевые слова: аттенуация, вирус гриппа, индукция интерферона, комплекс CPSF-30-NS1, белки полимеразного комплекса, мутации

S.G.Markushin, O.A.Svitich, A.R.Kinkulkina, I.B.Koptyaeva, K.V.Lisovskaya

MECHANISMS OF ATTENUATION OF COLD-ADAPTED STRAIN A/KRASNO-DAR/101/35/59 (H2N2)

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Aim. Study of mechanisms of attenuation of cold-adapted (ca) influenza virus strain A/Krasnodar/101/35/59 (H2N2), associated with disruption of NS1 protein functions. *Materials and methods.* Study of interferonogenic activity of ca strain A/Krasnodar/101/35/59 (H2N2), its parent variant A/Krasnodar/101/59 (H2N2), virulent strain A/WSN/33 (H1N1) and a number of single gene and multiple gene reassortants between these strains, obtained using reverse genetics, was carried out. Study of dynamics of IFN β gene expression was carried out by using a methodical approach of RT-PCR in real time mode. *Results.* Inclusion of PB-1 gene of ca strain A/Krasnodar/101/35/59 (H2N2) with reversion to wild type into genome composition of virulent strain A/WSN/33 (H1N1) does not result in a sharp change of interferonogenic activity of the reassortant. At the same time, similar inclusion of PB-1 gene of ca strain resulted in an incredible growth of interferonogenic activity of the reassortant. On the other hand, inclusion of NP-gene of wild type strain A/Krasnodar/101/59 (H2N2) into genome composition of the wild type strain A/WSN/33 did not differ by effect on interferonogenicity of the reassortant from inclusion of NP-gene of ca strain. *Conclusion.* Both constellations of genes of parent variants and mutations localized in these genes could affect formation of attenuation phenotype of reassortants. The data obtained allow to assume possible mechanisms of attenuation of ca strains, associated with disruption of NS gene function.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 2, P. 49—56

Key words: attenuation, influenza virus, interferon induction, CPSF-30-NS1 complex, polymerase complex proteins, mutations

ВВЕДЕНИЕ

NS-ген вируса гриппа А является главным фактором вирулентности данного вируса. Важнейшая функция NS1 белка заключается в подавлении индукции интерферонов I типа (ИФН α , ИФН β) в инфицированных клетках, что позволяет вирусу реплицироваться в клетках хозяина. NS1 белок подавляет индукцию интерферона двумя путями: во-первых, NS1 белок может маскировать вирусспецифическую РНК [14] и интерферировать с активацией рецептора Rig-1, вовлеченного в распознавание белков вируса гриппа [7, 9, 11]. Во-вторых, NS1 может связываться с клеточным белком CPSF 30, ответственным за процессинг клеточных мРНК и предотвращать ядерный экспорт вновь транскрибированных мРНК, включая мРНК, кодирующих ИФН β [10]. Было показано, что вирусный полимеразный комплекс является интегральным компонентом белкового комплекса CPSF 30-NS1 в инфицированных клетках и обеспечивает стабильность данного комплекса [12].

При анализе ts и att-фенотипа одногенных и полигенных реассортантов, полученных между ХА штаммом А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) [1, 2] и вирулентным штаммом А/WSN/33 с помощью обратной генетики, было обнаружено, что генетические детерминанты, ответственные за ts и att-фенотип ХА штамма, локализованы в PB1- и NS-генах [5, 6]. Однако сравнительное исследование нуклеотидной последовательности NS-гена ХА штамма и его родительского варианта А/Краснодар/101/59 (H2N2) показало отсутствие мутационных изменений в NS-гене ХА штамма. Можно было предположить, что родительский вариант А/Краснодар/101/59 изначально был частично аттенуирован. Тем не менее, исследование фенотипических характеристик штамма А/Краснодар/101/59 показало, что данный штамм хорошо размножался при повышенной температуре (38°C) и обладал вирулентностью для мышей при интраназальном заражении.

Принимая во внимание результаты исследований R.Krug et al. [12] можно было предположить, что мутации в белках полимеразного комплекса ХА штамма могли повлиять на активность NS1 белка данного штамма. В связи с этим, целью данной работы являлось исследование влияния отдельных мутантных белков полимеразного комплекса ХА штамма на интерферогенную активность реассортантов для оценки сравнительного вклада констелляции генов и мутаций, локализованных в этих генах, в формирование аттенуационного фенотипа реассортантов. Исследование проводилось на модели одногенных и полигенных реассортантов, полученных между ХА штаммом А/Краснодар/101/35/59, его родительским штаммом А/Краснодар/101/59 и вирулентным штаммом А/WSN/33.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали ХА штамм А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) вируса гриппа [1, 2], исходный родительский штамм А/Краснодар/101/59 (H2N2), вирулентный штамм А/WSN/33 (H1N1), одногенные и полигенные реассортанты, полученные между ХА штаммом, родительским штаммом и вирулентным штаммом А/WSN/33 с помощью обратной генетики [5, 6]. Также в отдельных опытах использовали реассортант, унаследовавший PB1-ген от ХА штамма, с реверсией в данном гене и остальные гены от штамма А/WSN/33.

Конструировали 8 плазмид, содержащих отдельные гены штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2). ХА штамм А /Краснодар/101/35/59(H2N2) был получен серийными пассажами исходного дикого штамма А/Краснодар/101/59 (H2N2) в куриных эмбрионах при постепенно снижающейся температуре. Восемь

сегментов кДНК ХА штамма были амплифицированы в ОТ-ПЦР из вирусспецифических геномных РНК со специфическими праймерами, содержащими рестрикционные сайты BsmB1. BsmB1 кДНК фрагменты были клонированы между двумя сайтами вектора pHW2000. Данный вектор был любезно предоставлен доктором Вебстером (St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, USA). Все восемь плазмид были секвенированы, и нуклеотидные замены, возникшие случайно в процессе клонирования были удалены.

Двойная клеточная культура 293Т/MDCK была трансфецирована набором из 8 плазмид с применением Lipofectamine LTX & PLUS™ Reagent (Invitrogen) по ранее описанному методу [8]. Полученный вирус был затем пассирован в аллантоисной полости куриных эмбрионов при 33°C.

Инфекционные титры вируса были установлены в куриных эмбрионах при 34°C и 38°C через 48 часов после инкубации инфицированных куриных эмбрионов при данной температуре по методу Рида-Менча. Наличие вирусов в эмбрионах определяли с помощью реакции гемагглютинации с использованием 0,5% куриных эритроцитов. Разница в репродукции вируса при оптимальной и повышенной температуре оценивалась как проявление ts-фенотипа. Изучение att-фенотипа проводили по следующему методу: мыши были инфицированы интраназально под легким эфирным наркозом с титром вируса $10^{7.0}$ ЭИД₅₀/0,2 мл в объеме 50 мкл на мыш. Через 72 часа после инфекции у забитых мышей были извлечены легкие. Из легочной ткани готовили 10% суспензию, которую титровали в куриных эмбрионах и выражали в lg ЭИД₅₀/0,2 мл. Все вирусные штаммы и реассортанты были исследованы в 3 независимых экспериментах.

Для изучения интерферонотропности вирусов использовали суточный монослой фибробластов эмбриона человека (ФЭЧ). Клетки заражали вирусами с множественностью 0,1 ЭИД₅₀/клетку в объеме 0,2 мл. Адсорбцию проводили в течение 30 мин, затем в лунки добавляли среду MEM, содержащую трипсин (T 1426, Sigma) в концентрации 2 мкг/мл. Через 3 часа и через 6 часов после начала инфекции из лунок удаляли среду, клетки обрабатывали лизирующим буфером в объеме 200 мкл (ИЛС, РФ).

Для исследования экспрессии гена врожденного иммунитета ИФНβ из клеток проводили выделение РНК с использованием набора «РИБОсорб» (ИЛС, РФ) строго в соответствии с протоколом. Выделенную РНК хранили при температуре минус 70°C. Далее проводили реакцию обратной транскрипции (ОТ) с использованием набора ОТ-1 (Синтол, РФ). Праймеры и зонды, используемые в реакциях ОТ-ПЦР, были подобраны к последовательностям мРНК (ИФНβ и GAP) с помощью программы Vector NTI 8.0 и синтезированы фирмой Синтол (РФ). Для проведения ПЦР в режиме реального времени использовали реакционную смесь, которую готовили из компонентов «Набора для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green 1» (Синтол, РФ). ПЦР-РВ проводили в амплификаторе PikoReal™ 96 Real-Time PCR System (Thermo Scientific, США). Реакцию проводили при следующем температурном режиме: 95°C — 5 мин (94°C — 20 сек, 60°C — 40 сек) — 40 циклов [4]. Расчет данных проводился с помощью программного обеспечения, прилагаемого к прибору PikoReal™ 96. Данные по экспрессии генов представлены в десятичных логарифмах (относительно экспрессии гена GAP). Статистический анализ полученных данных проводился с помощью программы Microsoft Office Excel 2003. Для оценки достоверности различий применяли непараметрический критерий Манна-Уитни. Различие показателей считалось достоверным при уровне значимости менее 0,05 [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ

На начальной стадии работы было проведено сравнительное изучение фенотипических характеристик родительских вариантов и отдельных реассортантов.

Характеристика ts и att-фенотипа одногенных и полигенных реассортантов между ХА штаммом А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) и вирулентным штаммом А/WSN/33 (H1N1)

| Вирусы | Генотип реассортантов | | | | | | | | | Титр вирусов, lg ЭИД ₅₀ /0,2мл | | Титр вирусов в легких мышей, lg ЭИД ₅₀ /1 г легких |
|-----------|-----------------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|----------|---|-----------|---|
| | | | | | | | | | | 34°C | 38°C | |
| A/WSN/33 | PB2 | PB1 | PA | HA | NP | NA | M | NS | 6,5±0,5 | 6,2±0,4 | 5,16±0,56 | |
| A/KR (ДТ) | PB2 | PB1 | PA | HA | NP | NA | M | NS | 6,0±0,5 | 5,8±0,4 | 4,5±0,40 | |
| A/KR ХА | PB2 | PB1 | PA | HA | NP | NA | M | NS | 6,2±0,5 | <1,0 | <1,0 | |
| 1 | PB2 | PB1 | PA | HA | NP | NA | M | NS | 5,0±0,5 | 4,5±0,5 | 4,5±0,81 | |
| 2 | PB2 | PB1 | PA | HA | NP | NA | M | NS | 6,5±0,32 | 1,5±0,4 | 2,0±0,70 | |
| 3 | PB2 | PB1 | PA | HA | NP | NA | M | NS | 6,2±0,25 | 6,5±0,2 | 3,5±0,91 | |
| 4 | PB2 | PB1 | PA | HA | NP | NA | M | NS | 5,7±0,74 | 6,0±0,8 | 5,0±0,50 | |
| 5 | PB2 | PB1 | PA | HA | NP | NA | M | NS | 4,7±0,25 | 3,7±0,2 | 3,5±0,40 | |
| 6 | PB2 | PB1 | PA | HA | NP | NA | M | NS | 6,5±0,4 | <1,0 | <1,0 | |
| 7 | PB2 | PB1 | PA | HA | NP | NA | M | NS | 6,5±0,24 | <1,0 | 2,0±0,40 | |
| 8 | PB2 | PB1 | PA | HA | NP | NA | M | NS | 6,0±0,56 | 4,2±1,0 | 6,0±0,40 | |
| 9 | PB2 | PB1 | PA | HA | NP | NA | M | NS | 6,0±0,5 | 1,0 | 2,0±1,10 | |
| 10 | PB2 | PB1 | PA | HA | NP | NA | M | NS | 5,5±0,75 | <1,0 | <1,0 | |
| 11 | PB2 | PB1 | PA | HA | NP | NA | M | NS | 5,0±1,0 | 3,7±0,7 | 4,75±0,24 | |
| 12 | PB2 | PB1 | PA | HA | NP | NA | M | NS | 5,5±0,78 | <1,0 | <1,0 | |
| 13 | PB2 | PB1 | PA | HA | NP | NA | M | NS | 5,5±0,75 | <1,0 | <1,0 | |
| 14 | PB2 | PB1 | PA | HA | NP | NA | M | NS | 5,2±0,2 | <1,0 | <1,0 | |
| 15 | PB2 | PB1 | PA | HA | NP | NA | M | NS | 5,5±0,75 | <1,0 | <1,0 | |

Как видно из табл., исходный родительский штамм А/Краснодар/101/59 (H2N2) одинаково хорошо размножался при оптимальной (34°C) и повышенной (38°C) температуре в куриных эмбрионах, а также активно реплицировался в легких мышей. Сходными фенотипическими характеристиками обладал вирулентный штамм А/WSN/33 (H1N1). С другой стороны, ХА штамм А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) хорошо размножался в куриных эмбрионах при 34°C и не размножался при повышенной температуре (38°C), и его репликация не наблюдалась в легких мышей. Включение генов ХА штамма в геном вирулентного штамма А/WSN/33 (H1N1) сопровождалось различными эффектами. Как видно из табл., включение единичных сегментов РНК ХА штамма, кодирующих белки PB1 или NS1/ NS2, приводило к появлению реассортантов, не способных к размножению при 38°C и утративших вирулентность для мышей. В то же время, при введении в геном вирулентного штамма А/WSN/33 генов ХА штамма, кодирующих мутантные белки PA, PB2 и NP, фенотипические признаки вирулентного штамма менялись незначительно. При изучении полигенных реассортантов было отмечено, что дополнительное включение генов ХА штамма в геном вирулентного штамма, в особенности генов, кодирующих белки PB1 и NS, приводило к более выраженному про-

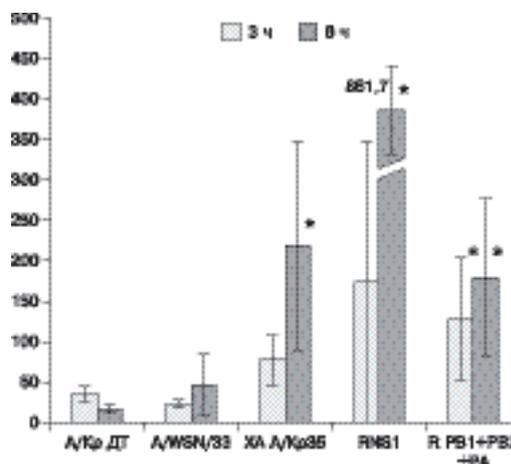


Рис. 1. Индукция экспрессии гена ИФНβ под действием различных штаммов вируса гриппа и реассортантов, полученных между ХА штаммом А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) и штаммом А/WSN/33 (H1N1).

По оси абсцисс — штаммы вируса гриппа и реассортанты, по оси ординат — кол-во копий гена ИФНβ относительно 10³ копий гена GAP, * p<0,05 (здесь и на рис. 2, 3).

явлению аттенуационного фенотипа. С другой стороны, полигенный реассортант, содержащий PB2 и NP-гены от ХА штамма, а остальные гены от штамма А/WSN/33, характеризовался только умеренным изменением ts-фенотипа и активной репродукцией в легких мышей.

На следующем этапе работы мы попытались определить оптимальное время индукции ИФНβ в клетках, инфицируемых исследуемыми вирусами. Полученные нами данные показали, что в клетках ФЭЧ, инфицированных вирусом гриппа, индукция ИФНβ наблюдалась в диапазоне 3 — 6 часов после начала инфекции. Как видно из рис. 1, в клетках ФЭЧ, инфицированных диким штаммом А/Краснодар/101/59 (H2N2), наблюдалось заметное подавление индукции ИФНβ в указанном временном интервале. Аналогичная картина наблюдалась в клетках, инфицированных вирулентным штаммом А/WSN/33. Однако в клетках, инфицированных ХА штаммом А/Краснодар/101/35/59 (H2N2), наблюдалась значительная индукция ИФНβ. Количество копий гена ИФНβ относительно $10^{3.0}$ копий референс-гена GAP превышало 2×10^2 . Самый высокий уровень индукции ИФНβ наблюдался в клетках, инфицированных реассортантом, геном которого содержал только NS-ген от ХА штамма, а остальные гены от штамма А/WSN/33 (детектируется около $8 \times 10^{2.0}$ копий относительно $10^{3.0}$ копий референс-гена GAP). Интересно отметить, что значительная активность ИФНβ наблюдалась в клетках, инфицированных реассортантом, геном которого включал гены, кодирующие белки полимеразного комплекса PB1, PB2, PA от ХА штамма, а остальные гены, включая NS-ген, от вирулентного штамма А/WSN/33. Отмечен синтез около $2 \times 10^{2.0}$ копий гена ИФНβ относительно $10^{3.0}$ копий референс-гена GAP. Этот факт подтверждает данные работы [12], свидетельствующие о том, что полимеразный комплекс вируса гриппа является интегральной частью белкового комплекса CPSF-30-NS1, ответственного за подавление индукции интерферона в инфицированных клетках.

На следующей стадии работы мы исследовали сравнительное влияние констелляции генов и мутаций, локализованных в этих генах, на формирование аттенуационного фенотипа реассортантов. Включение в геном вирулентного штамма А/WSN/33 (H1N1) PB1-гена ХА штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) с мутацией в позиции 464 (U-C) приводила к запредельному росту интерферогенной активности в инфицированных клетках ($1,53 \times 10^{3.0}$ копий гена ИФНβ относительно $10^{3.0}$ копий референс-гена (рис. 2)). В то же время, включение в состав генома вирулентного штамма А/WSN/33 (H1N1) PB1-гена ХА штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) с реверсией этой мутации не вызывало резкого изменения интерферогенной активности полученного реассортанта (рис. 3). С другой стороны, включение в состав генома вирулентного штамма А/WSN/33 (H1N1) NP-гена штамма А/Краснодар/101/59 (H2N2) не отличалось по эффекту на интерферогенность реассортанта от включения NP-гена ХА штамма, со-

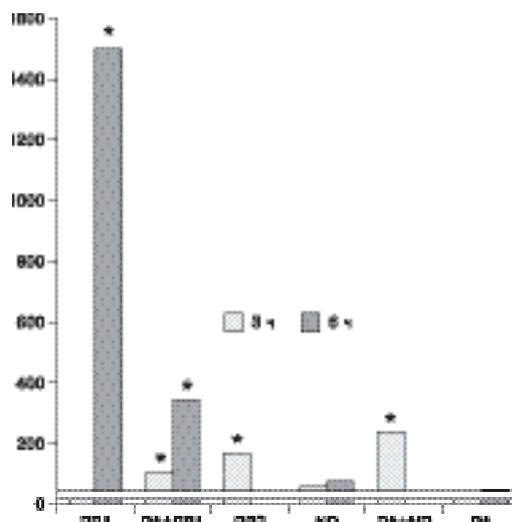


Рис. 2. Индукция экспрессии гена ИФНβ под действием различных реассортантов вируса гриппа, полученных между ХА штаммом А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) и штаммом А/WSN/33 (H1N1).

По оси абсцисс — реассортанты вируса гриппа, горизонтальная область по оси абсцисс — контрольное (фоновое) значение экспрессии гена ИФНβ в культуре (здесь и на рис. 3).

держашего мутацию А-У в позиции 1151 и мутацию С-У в позиции 1153 (рис. 2, 3).

Как видно из рис. 2, включение РА- и РВ2-генов ХА штамма в геном штамма А/WSN/33 либо незначительно влияло на эффективность подавления интерферогенной активности реассортантов, либо сопровождалось умеренной индукцией интерферона в инфицированных клетках. Дополнительное включение генов полимеразного комплекса ХА штамма в геном вирулентного штамма А/WSN/33 также могло приводить к противоположному эффекту. В частности, дополнительное включение РВ2-гена ХА штамма в геном реассортанта, уже имеющего NP-ген от ХА штамма, приводило к небольшому повышению индукции интерферона. В то время, как дополнительное включение РА-гена от ХА штамма в геном реассортанта, уже имеющего РВ1-ген от ХА штамма, вызывало резкое снижение индукции интерферона (рис. 2).

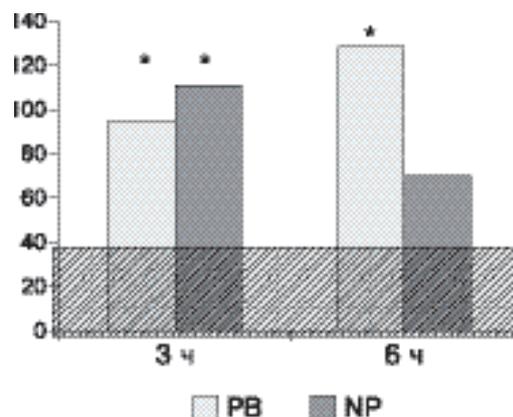


Рис. 3. Индукция экспрессии гена ИФβ под действием реассортанта между ХА штаммом А/Краснодар/101/35/59 (H2N2), имеющего реверсию в РВ1-гене, и штаммом А/WSN/33, а также реассортанта между диким штаммом А/Краснодар/101/59 (H2N2) и штаммом А/WSN/33.

По оси абсцисс — реассортанты вируса.

ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении изменчивости фенотипических признаков ХА реассортантов вируса гриппа — кандидатов в живые вакцины, полученных при скрещивании двух родительских вариантов, трудно отдифференцировать влияние констелляции генов от влияния мутаций, локализованных в этих генах. Как показали результаты наших экспериментов, в формировании фенотипа реассортантов свой вклад может вносить как констелляция генов, так и мутационные изменения в генах участников реассортации. При этом влияние мутаций, локализованных во внутренних генах донора аттенуации, на фенотип реассортанта может широко варьировать. Так, мутация в РВ1-гене ХА штамма в позиции 464 (U-C) могла изменить не только ts- и att-фенотип, но также значительно повысить интерферогенность полученного реассортанта.

Исследование интерферогенной активности NS1-белка вируса гриппа, проведенное R.Krug et al. [12], показало, что вирусспецифический полимеразный комплекс является интегральным компонентом белкового комплекса CPSF-30-NS1 в инфицированных клетках. Для стабилизации комплекса CPSF-30-NS1 необходимы родственные полимеразные белки РА и NP, но не РВ1 или РВ2 [12]. Полученные нами данные совпадают с данными R.Krug et al. Как видно из наших данных, включение белков NP и РА от ХА штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) в геном вирулентного штамма А/WSN/33 не приводило к дестабилизации белкового комплекса CPSF-30-NS1, ответственного за подавление индукции интерферона в инфицированных клетках. Однако дополнительное включение в состав генома реассортантов мутантных полимеразных белков РВ2 и РВ1 от ХА штамма уже приводит к дестабилизации комплекса CPSF-30-NS1 и повышению индукции интерферона. Как нами было показано, наибольшая индукция интерферона наблюдалась в клетках, инфицированных штаммом А/WSN/33, в состав генома которого был включен мутантный полимеразный белок РВ1 от ХА штамма. Этот факт свидетельствует о том, что стабилизация комплекса CPSF-30-NS1 контро-

лируется не индивидуальными белками полимеразного комплекса, а единым комплексом, где отдельные белки тесно взаимодействуют друг с другом. Анализ интерферогенной активности исследуемых реассортантов указывает на отсутствие строгой корреляции между аттенуацией вируса и способностью вызывать индукцию интерферона. Так, исследованный нами полигенный реассортант, имеющий в составе генома гены NP и PB2 от ХА штамма, по ts- и att-фенотипу был близок к вирулентному штамму А/WSN/33, однако характеризовался умеренной индукцией интерферона.

Как сообщалось ранее [5, 6, 13], NS-ген ХА штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) содержит ключевые детерминанты, ответственные за ts- и att-фенотип данного штамма, однако не имеет никаких мутационных изменений. Полученные нами данные позволяют объяснить этот феномен. Можно предположить, что в процессе длительных пассажей вируса при пониженной температуре в генах, кодирующих белки полимеразного комплекса, возник ряд кодирующих мутаций, изменивших структуру данных белков и превративших эти белки из «родственных» в «неродственные». Эти события могли нарушить контроль этих белков за стабильностью вирусспецифического комплекса CPSF-NS1, что привело к снижению способности ХА штамма ингибировать индукцию интерферона и утрате вирулентных свойств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гендон Ю.З., Маркушин С.Г., Цфасман Т.М. и др. Новые холодоадаптированные штаммы-доноры аттенуации для живых вакцин против гриппа. Вопросы вирусологии. 2013, 1: 11-17.
2. Гендон Ю.З., Маркушин С.Г., Аكوпова И.И. и др. Аттенуированный холодоадаптированный штамм вируса гриппа А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) для получения штаммов живой интраназальной гриппозной вакцины. Патент РФ на изобретение № 2354695.
3. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М., Практика, 1999.
4. Свитич О.А., Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В. и др. Аналитический подход в изучении противовирусного и иммуномодулирующего действия препаратов на модели герпес-вирусной инфекции *in vitro*. Российский иммунологический журнал. 2013, 4: 377-384.
5. Терехов А.В., Цфасман Т.М., Маркушин С.Г. и др. Генетические основы аттенуации холодоадаптированного штамма А(H2N2)/Краснодар/101/35/59-донора для живых гриппозных вакцин. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2013а, 3 (70): 70-77.
6. Терехов А.В., Цфасман Т.М., Маркушин С.Г. и др. Изучение att- фенотипа реассортантов между вирулентным штаммом вируса гриппа А(H1N1)/WSN/33 и вакцинным холодоадаптированным штаммом вируса гриппа А(H2N2)/Краснодар/101/35/59. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2013b, 5 (72): 41-47.
7. Gack M.U., Albrecht R.A., Urano T. et al. Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-1. *Cell Host Microbe*. 2009, 5: 439-449.
8. Hoffmann E., Krauss S., Perez D. et al. Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines. *Vaccine*. 2002, 20: 3165-3170.
9. Mibayashi M., Martinez-Sobrido L., Loo Y.M. et al. Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. *J. Virol*. 2007, 81: 514-524.
10. Noah D.L., Twu K.Y., Krug R.M. Cellular antiviral responses against influenza A virus are countered at the posttranscriptional level by the viral NS1A protein via its binding to a cellular protein required for the 3' end processing of cellular pre-mRNAs. *Virology*. 2003, 307: 386-395.
11. Pichlmair A., Schulz O., Tan C.P. et al. RIG-1-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'- phosphates. *Science*. 2006, 314: 997-1001.

12. Rei-Lin Kuo, Krug R. M. Influenza A virus polymerase is an integral component of the CPSF30-NS1A protein complex in infected cells. *J. Virol.* 2009, 83: 1611-1616.
13. Tsfasman T.M., Markushin S.G., Akopova I.I. et al. Molecular mechanisms of reversion to the ts+ phenotype of influenza a cold-adapted (ca)virus strain. *J. Gen. Virol.* 2007,88: 2724-2729.
14. Wang W., Krug R.M. The RNA-binding and effector domains of the viral NS1 protein are conserved to different extents among influenza A and B viruses. *Virology.* 1996, 223: 41-50.

Поступила 15.07.15

Контактная информация: Маркушин Станислав Георгиевич,
115058, Москва, 1 Дубровская ул., 15, р.т. (495)674-02-47

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*В.А.Жуков, С.В.Кокорев, С.В.Рогожкина, Д.Г.Мельников,
А.И.Терентьев, Е.А.Ковальчук, Е.Ю.Вахнов, С.В.Борисевич*

ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ КАК ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ ПОКАЗАТЕЛЬ СОХРАНЯЕМОСТИ ТАБЛЕТИРОВАННОЙ ЖИВОЙ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ОСПЕННОЙ ВАКЦИНЫ (ТЭОВАК) В ПРОЦЕССЕ ХРАНЕНИЯ

48 Центральный НИИ МО РФ, Сергиев Посад, Московская область

Цель. Определение величины коэффициентов термостабильности ТЭОВак для прогноза сохраняемости вакцины (специфической биологической активности) в процессе гарантийного срока хранения. *Материалы и методы.* ТЭОВак (таблетки жевательные) в первичной упаковке выдерживали при повышенной температуре (ускоренные и стресс-испытания) и в установленных ФСП на препарат условиях (долгосрочные испытания). Биологическую активность вакцины определяли титрованием на 12-суточных куриных эмбрионах. *Результаты.* Экспериментально установлена корреляция между величиной коэффициентов термостабильности и сохраняемостью приготовленных серий кондиционного препарата на конечный срок хранения. *Заключение.* Коэффициенты термостабильности могут быть использованы в качестве прогностического показателя качества производимой таблетированной лекарственной формы препарата для оценки сохраняемости вакцины в процессе гарантийного срока хранения.

Журн. микробиол., 2016, № 2, С. 56—62

Ключевые слова: ТЭОВак, куриный эмбрион, активность, термостабильность, испытание, хранение

*V.A.Zhukov, S.V.Kokorev, S.V.Rogozhkina, D.G.Melnikov,
A.I.Terentiev, E.A.Kovalchuk, E.Yu.Vakhnov, S.V.Borisevich*

THERMAL STABILITY AS A PROGNOSTIC INDICATOR OF CONSERVATION OF LIVE EMBRYONIC SMALLPOX VACCINE (TEOVAC) DURING STORAGE

48 Central Research Institute of the Ministry of Defense of Russian Federation, Sergiev Posad, Moscow Region, Russia

Aim. Determination of values of coefficients of thermal stability of TEOVAc for prognosis of conservation of the vaccine (specific biological activity) during the process of warranty period storage. *Materials and methods.* TEOVAc (masticatory tablets) in primary packaging was kept at increased temperature (accelerated and stress-tests) and at the conditions established by PAP for the preparation (long-term tests). Biological activity of the vaccine was determined by titration on 12-day chicken embryos. *Results.* A correlation between the value of coefficients of thermal stability and conservation of the prepared series of the condition preparation at the final date of

storage was experimentally established. *Conclusion.* Coefficients of thermal stability could be used as a prognostic indicator of quality of the produced pelleted formulation of the preparation for evaluation of conservation of the vaccine during warranty period storage.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 2, P. 56—62

Key words: TEOVac, chicken embryo, activity, thermal stability, test, storage

ВВЕДЕНИЕ

Предметом изучения термостабильности лекарственных препаратов является получение экспериментальных данных для установления условий хранения и обоснованных сроков годности готовых продуктов. Кроме того, эти результаты учитываются в процессе разработки спецификации на дозированную форму в части выбора аналитических методов, способных надежно определять активное действующее вещество или продукты его деградации в смеси друг с другом, а также установления оптимальных требований к первичной упаковке [2, 6, 7, 14, 18, 20]. Критерием термостабильности служит сохранение терапевтических или профилактических свойств продукции в процессе надлежащего хранения и распределения.

Для изучения термостабильности лекарственных препаратов и, в частности, живых вакцин, иммуногенность которых обеспечивается присутствием, как правило, термолабильных вакцинных или аттенуированных штаммов микроорганизмов, используют следующие виды испытаний: долгосрочные — в установленных стандартом качества температурных условиях, ускоренные — при температуре $37,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ и стресс-испытания — при повышенной температуре $61,0 \pm 0,5$ или 100°C [4 — 7, 9, 14, 16, 18 — 20]. Для этого исследуемый продукт подвергают полной проверке в объеме требований стандарта качества. Далее препарат в той же упаковке, в какой он реализуется на этапе хранения и распределения, закладывается на хранение при температуре конкретного испытания.

В 48 ЦНИИ осуществляется лицензионный выпуск таблетированной живой эмбриональной оспенной вакцины для орального применения (торговое название ТЭОВак) на основе штамма Б-51 вируса вакцины (регистрационное удостоверение Р N001038/02-060810), предназначенной для вакцинопрофилактики натуральной оспы и ревакцинации лиц группы риска, работающих с ортопоксвирусами, патогенными для человека [3, 12]. Поскольку в мировой практике использовались оспенные вакцинные препараты только для парентерального введения [3 — 5, 15], при разработке ТЭОВак и в процессе ее усовершенствования, особенно в условиях ужесточения требований Минздрава России к соблюдению отечественных правил GMP на предприятиях-производителях лекарственных препаратов [8, 11], необходимы были исследования по изучению термостабильности таблетированной формы, что являлось целью настоящих исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Производственные серии ТЭОВак (таблетки жевательные) расфасовывали по 10 таблеток во флаконы ФО-10-НС-1А, укупоривали резиновыми пробками типа АБ и колпачками алюминиевыми типа К-2.

Часть упаковок каждой серии помещали в камеру-термостат на хранение при температуре от 2 до 8°C со строгим контролем температурного режима за весь период наблюдения. Так как, согласно Государственной фармакопее России, продолжительность долгосрочных испытаний должна быть не менее заявленного стандартом качества гарантийного срока годности препарата плюс 3 месяца [16], то для ТЭОВак этот срок равен 27 месяцам.

Другая часть этих же серий подвергалась испытаниям по оценке термостабиль-

ности ТЭОВак при температуре 37 и 61°C с максимальной продолжительностью экспозиции, используемой при анализе сухих оспенных вакцин [4, 5]. Поскольку процедура испытаний при температуре 37°C занимает длительное время, с целью устранения возможного влияния на результаты эксперимента чувствительности к вирусу вакцины разных партий куриных эмбрионов испытания проводили следующим образом.

Помещали в рефрижераторный инкубатор MIR-553 («Sanyo», Япония) необходимое количество укупок на прогрев при температуре $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (рабочий режим поддержания температуры в инкубаторе — от минус 10 до плюс 50°C). Через 7 суток часть укупок извлекали и помещали в морозильную камеру MDF-382 AT («Sanyo», Япония) при температуре минус 20°C. Аналогичный отбор образцов проводили на 14, 21 и 28 сутки прогрева. Подобным образом проводили испытания при $61 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в рефрижераторном инкубаторе VWR 1510E («VWR Scientific», США) (рабочий режим поддержания температуры — от 5 до 70°C). Отбор проб — через 1, 2, 3, 4 и 5 часов прогрева. Для определения исходной активности вакцины (нулевая точка) укупки без прогрева помещали в морозильную камеру в день начала испытания. Активность всех отобранных проб серии вакцины оценивали одновременно на единой партии куриных эмбрионов.

Специфическую активность таблеток определяли согласно методике, изложенной в инструкции по применению ОСО 42-28-113-07 [10], на 12-суточных куриных эмбрионах экспериментального птицеводческого хозяйства Всероссийского научно-исследовательского и технологического института птицеводства (Сергиев Посад, Московская область). Расчет величины специфической активности таблеток проводили по результатам трех определений объединенной пробы из трех отобранных упаковок. Статистический анализ осуществляли принятыми в биологии методами [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Специфическая активность таблеток, согласно промышленному регламенту, находится в широком диапазоне — от 2 до 60×10^6 ООЕ/табл. [13] (иммунная доза ТЭОВак для человека — от 1 до 30×10^6 ООЕ), что обусловлено стратегией применения вакцины (вакцинация или ревакцинация). Величина активности таблетки обеспечивается изменением процентного соотношения — сухой вирусосодержащий материал : наполнитель. Учитывая данное обстоятельство, для проведения исследований была проведена наработка трех производственных серий ТЭОВак с разной специфической активностью, что отвечает рекомендациям по количеству серий, необходимых для подобных исследований (от одной до трех серий) [5, 7, 14, 16].

На первом этапе исследовали динамику снижения активности (термоинактивации) вакцины каждой серии в трех испытаниях. Последующие расчеты проводили с учетом рекомендаций по изучению стабильности иммунобиологических препаратов [9]. Активность препарата уменьшается со временем по закону мономолекулярной реакции: $P_t = P_0 \cdot e^{-K_T t}$ (1) или $\ln P_t = \ln P_0 - K_T t$ (1a), где P_t — активность вакцины после экспозиции в течение времени t , P_0 — исходная активность вакцины, K_T — константа скорости инактивации при данной температуре T , e — основание натурального логарифма, t — длительность экспозиции препарата. Исходя из уравнения (1a), константа скорости термоинактивации (K_T) каждой серии ТЭОВак при испытываемой температуре может быть определена как тангенс угла наклона аппроксимированной прямой методом наименьших квадратов зависимости $\ln P_t$ от t [17].

По результатам определения K_T в трех испытаниях находили его стандартное отклонение (σ). Как следует из представленных в табл. 1 данных, достоверных различий в значении K_T для определенной температуры между сериями ТЭОВак не отмечено.

Оценка термостабильности серийной продукции в пострегистрационный период не предусматривает проведения контрольной лабораторией предприятия-изготовителя испытаний по полной схеме, а требует лишь проверки основного свойства действующего вещества образца до и после его выдержки в срок, достаточный для объективной оценки его изменения. Так, по данным ВОЗ, испытания на термостабильность живой вакцины против ветряной оспы проводят при $37,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ в течение 7 суток [19], а оспенной вакцины — 4 недели [5]. Для сухой дермальной оспенной вакцины, производимой НПО «Микроген» (филиал в г. Томск НПО «Вирион»), установлен срок 28 суток, но допускается использовать также прогревание вакцины при температуре $61,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ в течение 5 часов [4]. Для оценки термостабильности ТЭОВак использовали рекомендованные режимы испытаний для оспенной вакцины.

Учитывая широкий диапазон активности выпускаемой ТЭОВак, в качестве показателя стабильности применяли не абсолютное значение снижения активности, а относительную величину — коэффициент термостабильности ($K_{37^\circ\text{C}}$ или $K_{61^\circ\text{C}}$), который определяется как отношение активности вакцины в первичной упаковке до и после прогрева при соответствующей температуре испытания по формуле (2): $K=A_i:A_0$, где A_i — специфическая активность вакцины после прогрева, ООЕ/табл.; A_0 — исходная активность вакцины (до прогрева), ООЕ/табл.

Как следует из данных табл. 1, значения коэффициентов в трех сериях, независимо от температуры прогрева, достоверно не различаются и находятся в пределах от 0,0020 до 0,0039.

На следующем этапе исследований экспериментально оценивали сохраняемость анализируемых серий ТЭОВак в долгосрочных испытаниях. В условиях серийного производства продукция подвергается контролю каждые 6 месяцев хранения (при сроке годности до 3 лет), а в период хорошо освоенного производства (при сроке годности более 3 лет) — ежегодно [16].

Таблица 1. Результаты термоинактивации ТЭОВак

| Показатель | Номер серии | | |
|---------------------------|---|-------------------------------|-------------------------------|
| | 1 | 2 | 3 |
| Экспозиция, сутки (часы): | Активность ТЭОВак (ООЕ/табл.) после экспозиции при $61,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ | | |
| 0 | $(2,90 \pm 0,60) \times 10^6$ | $(4,93 \pm 1,59) \times 10^6$ | $(2,47 \pm 0,45) \times 10^7$ |
| 0,0417 (1) | $(1,83 \pm 0,29) \times 10^6$ | $(3,80 \pm 1,39) \times 10^6$ | $(1,40 \pm 0,26) \times 10^7$ |
| 0,0833 (2) | $(1,40 \pm 0,53) \times 10^6$ | $(3,43 \pm 0,82) \times 10^5$ | $(3,13 \pm 0,71) \times 10^6$ |
| 0,1250 (3) | $(2,63 \pm 1,18) \times 10^5$ | $(3,40 \pm 0,53) \times 10^5$ | $(8,52 \pm 0,58) \times 10^5$ |
| 0,1667 (4) | $(8,50 \pm 1,37) \times 10^4$ | $(3,77 \pm 0,87) \times 10^4$ | $(6,24 \pm 0,42) \times 10^5$ |
| 0,2083 (5) | $(9,60 \pm 2,08) \times 10^3$ | $(1,01 \pm 0,19) \times 10^4$ | $(9,67 \pm 0,58) \times 10^4$ |
| | Расчетные величины | | |
| K_T | $27,04 \pm 2,40$ | $30,72 \pm 3,22$ | $26,29 \pm 1,53$ |
| $K_{61^\circ\text{C}}$ | $0,0033 \pm 0,0011$ | $0,0020 \pm 0,0008$ | $0,0039 \pm 0,0015$ |
| Экспозиция, сутки: | Активность ТЭОВак (ООЕ/табл.) после экспозиции при $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ | | |
| 0 | $(3,53 \pm 1,18) \times 10^6$ | $(5,00 \pm 0,95) \times 10^6$ | $(1,80 \pm 0,75) \times 10^7$ |
| 7 | $(4,60 \pm 0,53) \times 10^5$ | $(1,98 \pm 1,09) \times 10^6$ | $(5,47 \pm 1,36) \times 10^6$ |
| 14 | $(3,67 \pm 1,15) \times 10^5$ | $(1,62 \pm 0,73) \times 10^5$ | $(7,63 \pm 0,93) \times 10^5$ |
| 21 | $(8,59 \pm 0,52) \times 10^4$ | $(7,60 \pm 1,40) \times 10^4$ | $(3,10 \pm 0,87) \times 10^4$ |
| 28 | $(8,75 \pm 0,25) \times 10^3$ | $(1,01 \pm 0,58) \times 10^4$ | $(4,60 \pm 0,26) \times 10^4$ |
| | Расчетные величины | | |
| K_T | $0,19 \pm 0,08$ | $0,21 \pm 0,04$ | $0,24 \pm 0,04$ |
| $K_{37^\circ\text{C}}$ | $0,0024 \pm 0,0009$ | $0,0020 \pm 0,0010$ | $0,0024 \pm 0,0011$ |

Примечание. Величина специфической активности — $\bar{X} \pm \sigma$ для $n=9$; значения K_T , $K_{61^\circ\text{C}}$, $K_{37^\circ\text{C}}$, — $\bar{X} \pm \sigma$ для $n=3$.

Как следует из табл. 2, не обнаружено снижения специфической активности вакцины всех серий за нижний предел иммунной дозы для человека в таблетке, что свидетельствует о стабильности наработанных серий вакцины и, как следствие, возможности использования установленных в эксперименте значений $K_{37^\circ\text{C}}$ и $K_{61^\circ\text{C}}$ в качестве прогностического показателя стабильности приготовленной серии.

Правомочность этого утверждения подтверждена результатами испытания стабильности двух других дополнительно наработанных серий ТЭОВак. Особенности процесса приготовления серий 4 и 5, трех

контрольных испытаний каждой серии на термостабильность и результаты сохраняемости в процессе хранения представлены в табл. 3.

Контроль готового препарата показал, что по показателям качества обе серии соответствуют требованиям ФСП 42-0906-07. Однако если серия № 5 отвечала установленным в экспериментах значениям $K_{37}^{\circ C}$ и $K_{61}^{\circ C}$, то у серии № 4 эти значения были на порядок ниже. При ретроспективном анализе возможных причин наблюдаемого было обнаружено,

Таблица 2. Результаты контроля специфической активности ТЭОВак в процессе хранения

| Срок хранения ТЭОВак при $5 \pm 3^{\circ C}$ (месяц) | Активность (ООЕ/табл., $\times 10^6$) | | | |
|--|--|---------------|---------------|----------------|
| | Требования [13] | Номер серии | | |
| | | 1 | 2 | 3 |
| 0 | От 2,0 до 60,0 | $3,0 \pm 0,7$ | $5,0 \pm 0,5$ | $20,0 \pm 0,6$ |
| 6 | — | $3,1 \pm 0,6$ | $4,5 \pm 0,7$ | $10,0 \pm 0,5$ |
| 12 | — | $2,8 \pm 0,5$ | $4,1 \pm 0,4$ | $9,0 \pm 0,7$ |
| 18 | — | $2,6 \pm 0,5$ | $2,6 \pm 0,6$ | $9,0 \pm 0,5$ |
| 24 | Не менее 1,0 | $1,7 \pm 0,6$ | $1,2 \pm 0,5$ | $6,2 \pm 0,5$ |
| 27 | — | $1,3 \pm 0,5$ | $1,4 \pm 0,3$ | $6,0 \pm 0,6$ |

Примечание. Величина специфической активности — $\bar{X} \pm \sigma$ для $n=3$.

Таблица 3. Результаты наработки дополнительных серий ТЭОВак и контрольных испытаний на стабильность

| Показатель, единица измерения | Требования | Результаты наработки и контроля серий | |
|--|---|---|-----------------------------|
| | | № 4 | № 5 |
| Контроль процесса производства [13] | | | |
| Выход по массе при сублимации вирусосодержащего материала, % | Не более 22,00 | 21,00 | 21,40 |
| Выход по специфической активности при сублимации, % | Не менее 20,00 | 4,40 | 21,14 |
| Контроль стабильности | | | |
| Специфическая активность приготовленной серии, ООЕ/табл. (экспозиция 0 суток) | От $2,0 \times 10^6$ до $6,0 \times 10^7$ | $(2,6 \pm 0,6) \times 10^6$ | $(1,9 \pm 0,4) \times 10^7$ |
| Специфическая активность после прогрева (5 ч, $61^{\circ C}$), ООЕ/табл. | — | $(7,0 \pm 1,1) \times 10^2$ | $(9,4 \pm 0,8) \times 10^4$ |
| Коэффициент термостабильности ($K_{61}^{\circ C}$) | Не менее 0,002 | $0,0003 \pm 0,0002$ | $0,0049 \pm 0,0005$ |
| Специфическая активность после прогрева (28 суток, $37^{\circ C}$), ООЕ/табл. | — | $(2,5 \pm 0,7) \times 10^2$ | $(8,5 \pm 0,5) \times 10^4$ |
| Коэффициент термостабильности ($K_{37}^{\circ C}$) | Не менее 0,002 | $0,0001 \pm 0,0001$ | $0,0045 \pm 0,0003$ |
| Специфическая активность, ООЕ/табл., при хранении ТЭОВак (месяц) | | | |
| 6 | — | $(1,6 \pm 0,9) \times 10^6$ | $(9,5 \pm 0,4) \times 10^6$ |
| 12 | — | $(1,3 \pm 0,7) \times 10^6$ | $(9,0 \pm 0,5) \times 10^6$ |
| 18 | — | $(9,3 \pm 1,0) \times 10^5$ | $(7,8 \pm 0,7) \times 10^6$ |
| 24 | Не менее $1,0 \times 10^6$ | $(7,2 \pm 0,6) \times 10^5$ | $(5,4 \pm 0,5) \times 10^6$ |
| 27 | — | $(7,9 \pm 0,5) \times 10^5$ | $(5,3 \pm 0,8) \times 10^6$ |

Примечание. $\bar{X} \pm \sigma$ для $n=3$.

что при сублимационном высушивании жидкой вирусосодержащей биомассы (этап технологического процесса получения ТЭОВак) снижен выход материала по суммарной специфической активности почти в 5 раз по сравнению с требованиями промышленного регламента. Возможно, незначительное нарушение режимных параметров сушки явилось причиной изменения структуры вирусных частиц и, как следствие, снижения их устойчивости к повышенной температуре.

Неблагоприятный прогноз в отношении кондиционности серии № 4 подтвердился при контроле ее активности в процессе хранения.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведение экспериментальных исследований по оценке стабильности наработанных производственных серий ТЭОВак в испытаниях при повышенной температуре с использованием рекомендованных ВОЗ и применяемых отечествен-

ными производителями для оспенных вакцин условий термоинактивации (температура, срок прогрева, количество серий, статистическая обработка результатов) показало, что анализируемые серии ТЭОВак № 1, 2, 3 и 5 отвечали требованиям ФСП 42-0906-07 по показателям качества до и после хранения в течение гарантийного срока в надлежащих условиях.

Отсутствие достоверных отличий в динамике инактивации (K_T) при конкретной температуре серий, независимо от исходной специфической активности таблетки, свидетельствует о том, что устойчивость ТЭОВак является прерогативой самого вируса, а не компонентного состава прописи (соотношения в таблеточной массе — сухой вирусосодержащий материал : наполнитель). Подтверждением этому утверждению служат результаты анализа серии № 5. Резкое снижение устойчивости ТЭОВак серии № 4 к повышенной температуре демонстрирует нарушение стабильности препарата, что было подтверждено при последующем изучении процесса хранения (выход величины специфической активности вакцины за пределы установленной ФСП 42-0906-07 нормы в течение гарантийного срока хранения).

Таким образом, экспериментально установлена зависимость сохраняемости препарата в процессе установленных ФСП условий хранения от его устойчивости к повышенной температуре. Значения $K_{37\text{ °C}}$ и $K_{61\text{ °C}}$ для четырех кондиционных серий ТЭОВак с вероятностью 0,68 колеблется в пределах $0,0028 \pm 0,0011$ и $0,0035 \pm 0,0012$ соответственно.

Установленная зависимость позволяет ввести коэффициенты термостабильности $K_{37\text{ °C}}$ и $K_{61\text{ °C}}$ со значением не ниже 0,002 в качестве дополнительного факультативного прогностического показателя качества выпускаемой герметично упакованной серийной продукции ТЭОВак (таблетки жевательные). Результаты исследований стабильности ТЭОВак во флаконах ФО-10-НС-1А (флаконы из нейтрального стекла) в полной мере могут быть применимы для флаконов ФО-10-ОС-1 (флаконы из оранжевого стекла) и герметичных первичных тар большей вместимости (согласно Государственной фармакопее России при расфасовке лекарственных средств в крупногабаритную первичную тару для изучения стабильности допускается использование аналогичной упаковки меньшей емкости, достаточной для моделирования) [16].

ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин И.П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л., 1962.
2. Беликов В.Г. Фармацевтическая химия. Часть 1. Общая фармацевтическая химия. М., 1993.
3. Бондарев В.П., Терентьев А.И., Мельников С.А. и др. Внедрение таблетированной оспенной вакцины ТЭОВак в серийное производство для обеспечения безопасности населения Российской Федерации. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 2010, 2 (104): 66-68.
4. Вакцина оспенная живая (Вакцина оспенная), лиофилизат для приготовления раствора для внутрикожного введения и накожного скарификационного нанесения. ФСП 42-1124-07.
5. Доклад группы экспертов ВОЗ. Требования к биологическим веществам. Производственные предприятия и контрольные лаборатории — Полиомиелитная вакцина (инактивированная) — Полиомиелитная вакцина (пероральная) — Оспенная вакцина. Приложение 4. Требования к оспенной вакцине. Серия техн. докладов. 1965, 323: 67-69.
6. Мешковский А.П. Испытания стабильности и установление сроков годности лекарственных препаратов. Фарматека. 2000, 2: 25-34.
7. Мешковский А.П. Нормативные проблемы установления сроков годности. Ремедиум. 2008, 3: 36-39.
8. Надлежащая практика производства медицинских иммунобиологических препаратов: Санитарно-эпидемиологические правила. СП 3.3.2.1288-03. М., 2003.

9. Определение стабильности отраслевых стандартных образцов (ОСО) и других МИБП ускоренным методом. Методические рекомендации. ГНИИСК МБП им. Л.А. Тарасевича. М., 2003.
10. Отраслевой стандартный образец активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины (ОСО 42-28-113-07). Инструкция по применению. ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича. М., 2007.
11. Правила организации производства и контроля качества лекарственных средств. Утверждены приказом Минпромторга России № 916 от 14 июня 2013 г.
12. Проведение вакцинопрофилактики натуральной оспы. Методические указания. МУ 3.3.1.2044-06. М., 2006.
13. Промышленный регламент на производство ТЭОВак (вакцина оспенная эмбриональная живая), таблетки жевательные, таблетки покрытые оболочкой делимые. ПР 08534994-01-08.
14. Рудакова И.П. О рекомендациях ВОЗ по изучению стабильности воспроизведенных фармацевтических продуктов. Фарматека. 1996, 1: 39-40.
15. Руководство по вакцинному и сывороточному делу. П.Н. Бургасов (ред.). М., 1978.
16. Сроки годности лекарственных средств. ОФС 42-0075-07. Государственная фармакопея Российской Федерации. XII(1). М., 2008.
17. Тейлор Дж. Введение в теорию ошибок. М., 1985.
18. Guidelines for Stability Testing of Pharmaceutical Products Containing Well Drug Substances in Conventional Dosage Forms. WHO, Technical Report Series, No. 863, Geneva, 1996.
19. Draft. Requirements for Varicella Vaccine (live) (Requirements for Biological Substances # 36) (Revised 1992). Expert Committee on Biological Standardization. Geneva, 12-19 October 1993. WHO, BS/93.1717: 15.
20. Draft. Stability Testing of Active Pharmaceutical Ingredients and Pharmaceutical Products. WHO, Working document QAS/06.179/Rev.2, 2007.

Поступила 10.08.15

Контактная информация: Борисевич Сергей Владимирович, д.б.н., проф.,
141306, Сергиев Посад-6, Московская область, ул. Октябрьская, 11

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*А.Ю.Попова^{1,2}, А.Н.Куличенко³, О.В.Малецкая³, Н.Ф.Василенко³,
Л.И.Шапошникова³, Е.С.Котенев³, В.М.Дубянский³, А.С.Волынкина³,
Я.В.Лисицкая³, И.В.Самарина³, Н.А.Пеньковская⁴, И.Л.Евстафьев⁵,
Н.Н.Товпинцев⁵, Н.В.Цапко³, О.А.Белова³, Д.С.Аганитов³, Т.Н.Самодед⁵,
А.А.Надольный⁶, И.С.Коваленко⁶, С.Н.Якунин⁶, Н.К.Шварсалон⁶, Л.С.Зинич⁶,
С.Н.Тихонов⁶, Г.И.Лямкин³, И.В.Жарникова³, Ю.М.Евченко³*

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ОБСТАНОВКА ПО ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫМ ИНФЕКЦИЯМ В КРЫМСКОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ В 2014 — 2015 ГГ.

¹Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, ²Российская медицинская академия последипломного образования, Москва; ³Ставропольский противочумный институт; ⁴Управление Роспотребнадзора по Республике Крым и городу федерального значения Севастополь, ⁵Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Крым и городе федерального значения Севастополь, ⁶Противочумная станция Республики Крым, Симферополь

Цель. Анализ эпидемических проявлений природно-очаговых инфекций (ПОИ), уточнение спектра их возбудителей, определение эпизоотической активности природных очагов в Крымском федеральном округе (КФО). *Материалы и методы.* Проведено эпизоотологическое обследование 10 административных районов КФО. 291 пул (2705 особей) иксодовых клещей и 283 пробы органов мелких млекопитающих исследованы методом ПЦР на наличие ДНК/РНК возбудителей ряда ПОИ. *Результаты.* Заболеваемость ПОИ в КФО регистрировалась по 6 нозологиям: клещевому боррелиозу, марсельской лихорадке, лептоспирозу, туляремии, кишечному иерсиниозу и клещевому вирусному энцефали-

ту, при этом трансмиссивные инфекции составили 91,6%. Установлена циркуляция возбудителей Крымской геморрагической лихорадки, лихорадки Ку, группы клещевых пятнистых лихорадок, клещевого боррелиоза, гранулоцитарного анаплазмоза человека, моноцитарного эрлихиоза человека, геморрагической лихорадки с почечным синдромом, лихорадки Западного Нила, туляремии и лептоспироза. *Заключение.* В связи с активностью природных очагов ПОИ для обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения КФО необходим дальнейший мониторинг эпидемиологических и эпизоотологических проявлений данных инфекций в Крыму, в том числе с использованием генетических методов анализа.

Журн. микробиол., 2016, № 2, С. 62—69

Ключевые слова: заболеваемость, инфекционные болезни, эпизоотологический мониторинг, эпидемические проявления, природно-очаговые инфекции, иксодовые клещи, мелкие млекопитающие, Крымский федеральный округ

A. Yu. Popova^{1,2}, *A. N. Kulichenko*³, *O. V. Maletskaya*³, *N. F. Vasilenko*³,
*L. I. Shaposhnikova*³, *E. S. Kotenev*³, *V. M. Dubyansky*³, *A. S. Volynkina*³,
*Ya. V. Lisitskaya*³, *I. V. Samarina*³, *N. A. Penkovskaya*⁴, *I. L. Evstafiev*⁵,
*N. N. Tovpinets*⁵, *N. V. Tsapko*³, *O. A. Belova*³, *D. S. Agapitov*³, *T. N. Samoded*⁵,
*A. A. Nadolny*⁶, *I. S. Kovalenko*⁶, *S. N. Yakunin*⁶, *N. K. Shvarsalon*⁶, *L. S. Zinich*⁶,
*S. N. Tikhonov*⁶, *G. I. Lyamkin*³, *I. V. Zharnikova*³, *Yu. M. Evchenko*³

EPIDEMIOLOGIC SITUATION BY NATURAL-FOCI INFECTIONS IN THE CRIMEA FEDERAL DISTRICT IN 2014 — 2015

¹Federal Service for Surveillance on Consumer Rights' Protection and Human Well-being; ²Russian Medical Academy of Post-Graduate Education, Moscow; ³Stavropol Institute for Plague Control; ⁴Administration of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights' Protection and Human Well-being for the Crimea Republic and Sevastopol City of Federal Importance, ⁵Centre of Hygiene and Epidemiology in the Crimea Republic and Sevastopol City of Federal Importance, ⁶Station for Plague Control of the Crimea Republic, Simferopol, Russia

Aim. Analysis of epidemic manifestations of natural-foci infections (NFI), clarification of spectrum of their causative agents, determination of epizootic activity of natural foci in the Crimea Federal District (KFD). *Materials and methods.* Epizootologic examination of 10 administrative districts of KFD was carried out. 291 pools (2705 specimens) of ixodes ticks and 283 samples of organs of small mammals were studied by PCR method for the presence of DNA/RNA of causative agents of a number of NFI. *Results.* Morbidity by NFI in KFD was registered by 6 nosologies: Lyme borreliosis, Marseilles fever, leptospirosis, tularemia, intestine yersiniosis and tick-borne viral encephalitis, wherein, transmissible infections made up 91.6%. Circulation of causative agents of Crimea hemorrhagic fever, Q fever, group of tick-borne spotted fever, Lyme borreliosis, human granulocytic anaplasmosis, human monocytic ehrlichiosis, hemorrhagic fever with renal syndrome, West Nile fever, tularemia and leptospirosis was established. *Conclusion.* Due to activity of natural foci of NFI further monitoring of epidemiologic and epizootologic manifestations of these infections in the Crimea, including using genetic methods of analysis, is necessary for ensuring sanitary-epidemiologic welfare of KFD population.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 2, P. 62—69

Key words: morbidity, infectious diseases, epizootologic monitoring, epidemic manifestations, natural-foci infections, ixodes ticks, small mammals, Crimea Federal District

ВВЕДЕНИЕ

Территория Крымского федерального округа (КФО) эндемична по ряду природно-очаговых инфекций (ПОИ) вирусной и бактериальной этиологии, в том числе и трансмиссивных: Крымской геморрагической лихорадке (КГЛ), лихорадке Западного

Нила (ЛЗН), лихорадке Ку, марсельской лихорадке, клещевому боррелиозу (КБ), клещевому вирусному энцефалиту (КВЭ), туляремии. Кроме того, установлена циркуляция возбудителей геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС), лептоспироза, кишечного иерсиниоза, псевдотуберкулеза [2]. В связи с этим, постоянный эпидемиологический и эпизоотологический мониторинг в данном регионе — одна из главных задач в комплексе мер по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия.

Цель данной работы — анализ эпидемических проявлений природно-очаговых инфекций, уточнение спектра их возбудителей, определение эпизоотической активности природных очагов в Крымском федеральном округе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эпидсезон (весна—осень) 2014 — 2015 гг. проведено эпизоотологическое обследование окрестностей 35 населенных пунктов 10 административных районов КФО (Бахчисарайского, Белогорского, Ленинского, Сакского, Симферопольского, Судакского, Феодосийского, Черноморского, Ялтинского и Алуштинского), находящихся в различных ландшафтно-географических зонах.

Весной 2014 г. было выставлено 1294 ловушко-ночей, поймано 78 мелких млекопитающих, осенью — 1500 ловушко-ночей, добыто 450 мелких млекопитающих. В 2015 г. выставлено 200 ловушко-ночей, поймано 5 зверьков. Учеты численности кровососущих членистоногих были проведены на крупном рогатом скоте (КРС), на флаге и на учетчика.

Собранный в ходе эпизоотологического обследования полевой материал (иксодовые клещи, пробы головного мозга, легких, печени, селезенки, почек и крови мелких млекопитающих) исследован молекулярно-генетическим методом (ПЦР) на наличие ДНК/РНК возбудителей КГЛ, ЛЗН, лихорадки Ку, КВЭ, КБ, группы клещевых пятнистых лихорадок (КПЛ), гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ), моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ), ГЛПС, туляремии и лептоспироза с использованием коммерческих ПЦР тест-систем (ООО «ИнтерЛабСервис», Москва).

Молекулярно-генетическое типирование вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ) осуществляли методом прямого секвенирования трех участков генома вируса: фрагментов 115 — 652 кодирующей области малого (S) сегмента генома (538 п.о.), фрагмента 4620 — 5075 кодирующей области среднего (M) сегмента генома (435 п.о.) и фрагмента 105 — 541 кодирующей области большого (L) сегмента генома (437 п.о.) с последующим филогенетическим анализом (позиции фрагментов приводятся по полноразмерным последовательностям S-, M-, и L-сегментов генома штамма ROS/HUVLV-100, GenBank DQ206447, DQ206448, AY995166).

Генетическое типирование риккетсий группы КПЛ проводили методом MLST с расшифровкой нуклеотидных последовательностей 6 генов (17kDa, *atpA*, *dnaK*, *gltA*, *ompA*, *ompB*) [Torina A. et al., 2012].

ПЦР-продукты очищали с помощью набора реагентов AxyPrep™ PCR Cleanup Kit (Axygen Biosciences, США). Расшифровку нуклеотидных последовательностей полученных ПЦР-продуктов осуществляли на автоматическом секвенаторе «ABI 3500 Genetic Analyser» (Applied Biosystems, США) с набором реагентов «Big Dye Terminator Kit v.3.1.», амплифицированная ДНК была секвенирована по обеим цепям.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В 2014 г. в КФО регистрировалась заболеваемость природно-очаговыми инфекциями по 4 нозологиям: лептоспирозу, клещевому боррелиозу, кишечному иерсиниозу и марсельской лихорадке; в 2015 г. (8 мес.) — по 5 нозологиям: туляремии, лептоспирозу, КБ, марсельской лихорадке и клещевому вирусному энцефалиту.

Больных лептоспирозом в 2014 г. выявляли в Бахчисарайском районе (1 случай) и в городе федерального значения Севастополь (2 случая, интенсивный показатель заболеваемости на 100 тыс. населения, ИП — 0,5). Два случая закончились летальным

исходом: в Бахчисарайском районе и в г. Севастополь. В 2015 г. (8 мес.) 2 случая лептоспироза (1 — с летальным исходом) зарегистрированы в г. Севастополь, 1 случай — в Симферопольском районе. У всех больных болезнь протекала в желтушно-геморрагической форме, диагноз подтвержден методами РМА и ПЦР.

Клещевым боррелиозом в 2014 г. заболели 24 человека (ИП 1,0), 50% — в г. Симферополь (12), 33,3% — на территории Большой Ялты. По 1 случаю выявлено в городах Феодосия и Евпатория, 2 — в г. Севастополь. Случаи заболевания КБ регистрировались в течение всего года, за исключением марта. Диагноз клещевого боррелиоза всем больным поставлен непосредственно при обращении в лечебно-профилактические организации (ЛПО), у 45,8% больных подтвержден методами ИФА (наличие специфических IgM и IgG) и ПЦР. Все больные в анамнезе указали укус клеща.

В 2015 г. (8 мес.) заболеваемость КБ повысилась на 20%. Заболевания зарегистрированы в Симферопольском, Белогорском, Сакском районах (по 1 случаю), в городах Симферополь (11), Феодосия (3), Ялта (2), Керчь (1) и Севастополь (7). ИП составил 1,2. Среди заболевших — 26,7% детей в возрасте до 14 лет. Случаи заболевания регистрировались с апреля по август, 29 больных из 30 в анамнезе отмечали укусы клещей. В 100% случаев диагноз подтвержден методом ИФА.

В 2014 г. марсельская лихорадка регистрировалась среди городских жителей: Симферополя (2 случая), Керчи (1), Феодосии (2), Евпатории (3), Севастополя (5) и Судака (1). Всего заболели 14 человек, ИП составил 0,5. Самые высокие ИП отмечены в городах Судак (3,1) и Евпатория (2,4), минимальные — в Симферополе (0,56) и Керчи (0,68). Заболевания регистрировались только среди взрослого населения от 27 до 62 лет с мая по ноябрь, 71,5% из них выявлены в июле и августе.

Лабораторно методом ПЦР диагноз подтвержден в 50% случаев. Все случаи заболевания имели клиническую форму средней тяжести. Источник и условия заражения *Rickettsia conorii* не смогли определить у 3 больных, остальные связывают заболевание с укусом клещей или с их раздавливанием, 2 из них — в природных биотопах, 9 — при уходе за домашними собаками или снятии клещей с бродячих собак.

Число заболевших марсельской лихорадкой в 2015 г. (8 мес.) также составило 14 (ИП 0,5). Случаи заболевания регистрировались с апреля по август в Сакском (1), Симферопольском (1) и Ленинском (2) районах, городах Симферополь (3), Судак (1), Армянск (1) и Севастополь (5). Все больные в анамнезе отметили укусы клещей. Диагноз поставлен на основании клинических симптомов. В основном болезнь протекала в форме средней степени тяжести (57,1%), 1 (7,1%) случай — в тяжелой форме, в легкой форме — 35,8%.

В 2014 г. зарегистрировано по 1 больному кишечным иерсиниозом в Красногвардейском районе (ИП 1,1) и в г. Севастополь (ИП 0,25). Заболели дети 4 и 7 лет. В первом случае диагноз подтвержден бактериологическим методом, во втором — серологическим. В Красногвардейском районе случай квалифицирован как заносный из г. Тамбов.

В 2015 г. (8 мес.) 3 человека заболели клещевым вирусным энцефалитом: в Белогорском районе (2 случая, ИП 3,1) и г. Ялта (1 случай, ИП 0,7). Заболевания зарегистрированы в июне (1) и июле (2). Все больные в анамнезе указали укусы клещей. Клинический диагноз подтвержден методом ИФА (наличие специфических IgM и IgG).

Заболеваемость туляремией отмечена в Бахчисарайском (1 случай в марте, ИП 1,1) и Ленинском районах (1 случай в августе, ИП 0,08). Диагноз подтвержден лабораторно методом РНГА.

В мае 2015 г. в Воронежской области зарегистрирован заносный случай КГЛ из КФО. Тщательно проведенный эпидемиологический анализ позволил установить, что больная находилась в Крыму в туристическом походе и отмечала неоднократные укусы клещей. Диагноз КГЛ подтвержден лабораторно: в пробе клинического материала выявлена РНК вируса ККГЛ и IgM в титре >1:1600, поставлен диагноз КГЛ с геморрагическими проявлениями, тяжелое течение.

Таким образом, в 2014 г. и за 8 мес. 2015 г. в КФО зарегистрирована заболеваемость ПОИ по 6 нозологиям: клещевому боррелиозу, марсельской лихорадке, лептоспирозу, туляремии, кишечному иерсиниозу и клещевому вирусному энцефалиту, при этом трансмиссивные инфекции составили 91,6%. Наиболее высокая заболеваемость отмечена по КБ и марсельской лихорадке, причем по КБ в 2015 г. она повысилась на 20%. Летальные исходы при лептоспирозе регистрировались как в 2014 (66,7%), так и в 2015 г. (33,3%).

Обращает на себя внимание количество лиц, обратившихся в ЛПО по поводу укусов клещей. Так, в 2014 г. их было 1721, а за 8 мес. 2015 г. количество обращений составило 3897 (больше на 44,2%), из них детей до 14 лет — 1462. Доминирующими видами клещей были *Ixodes ricinus* (84, 8%) и *Hyalomma marginatum* (11,6%).

По данным эпизоотологического мониторинга, мелкие млекопитающие — носители возбудителей природно-очаговых инфекций — на территории Крыма представлены 11 видами: полевка обыкновенная — 24,7% (доля от вылова), полевка общественная — 14,9%, мышшь курганчиковая — 25,2%, мышшь степная — 19,0%, мышшь домовая — 6,4%, мышшь желтогорлая — 5,3%, мышшь малая лесная — 0,2%, хомячок серый — 3,5%, крыса серая — 0,2%, белозубка малая — 0,4%, белозубка белобрюхая — 0,2% [1].

В весенне-летний период доминирующим видом среди мелких млекопитающих, отловленных в открытых биотопах, была мышшь домовая. Индекс ее доминирования составил 44,9%. На долю полевки общественной и мышши степной приходится 25,6 и 24,3% соответственно. Наиболее низкие показатели доминирования установлены у хомячка серого и мышши курганчиковой: по 2,6%. Средняя численность носителей составила 6,0%. В степных ландшафтах западного Крыма отмечен наиболее высокий процент попадания — 9,0, тогда как в горных ландшафтах (восточные горы) и центральной степи этот показатель составил 5,9 и 4,7 соответственно.

В осенний период среди мелких млекопитающих доминировала полевка обыкновенная. Индекс ее доминирования — 29,9%. Доля других многочисленных видов — мышши курганчиковой и мышши степной составила 27,0 и 18,8% соответственно. Наиболее низкие показатели численности отмечены у мышши желтогорлой (6,3%) и хомячка серого (3,8%). Остальные виды мелких млекопитающих (белозубка малая, белозубка белобрюхая, крыса серая) представлены единичными экземплярами. Средняя численность мелких млекопитающих составила 25,9%. В зоне степей отмечен наиболее высокий процент попадания — 36,9, тогда как в зоне предгорий этот показатель был самым низким — 18,9%. В зоне гор процент попадания составил 22,8%.

За период эпизоотологического обследования с осмотренных животных и в открытых биотопах собраны иксодовые клещи (имаго и преимагинальные фазы), представленные 11 видами: *Hyalomma marginatum* — 17,5% от общего количества иксодид, *Haemaphysalis punctata* — 10,6%, *H. erinacei* — 0,1%, *Rhipicephalus bursa* — 57,6%, *R. turanicus* — 5,5%, *R. rossicus* — 0,1%, *R. sanguineus* — 0,1%, *I. ricinus* — 4,8%, *I. redikozevi* — 1,3%, *Dermacentor marginatus* — 2,3%, *D. reticulatus* — 0,1%.

В весенне-летний период 2014 г. индекс встречаемости основного резервуара и переносчика возбудителя КГЛ — имаго *H. marginatum* — на КРС составил 70,4%, индекс обилия — 2,5. В аналогичный период 2015 г. на КРС индекс встречаемости равнялся 82,8%, индекс обилия — 4,2; на лошадях индекс встречаемости — 100%, индекс обилия — 9,8; на мелком рогатом скоте (МРС) — 78,0 и 0,9% соответственно. Пик активности имаго *H. marginatum* в Крыму, как правило, приходится на апрель—май (2014 г.), как и в других частях ареала этого вида клеща, но в связи с выпадением осадков выше климатической нормы (весна, лето 2015 г.) резкого сезонного повышения численности имаго в эпидсезон 2015 г. не наблюдалось, и период активности переносчика был растянут до июня.

При обследовании степных ландшафтов в весенне-летний период с КРС собраны имаго *H. marginatum* и *H. punctata*. При обследовании природных биотопов на флаг

собраны имаго *R. bursa* (69,3% от количества собранных), *R. turanicus* (16,0%), *H. punctata* (14,7%). Индекс обилия иксодид на 1 фл/км составил 30,0. Такие показатели характерны для периода сбора. В местах обитания *H. marginatum* при отсутствии крупных прокормителей на учетчика за 1 час нападает в среднем 6 экз. имаго, что является эпидемически значимым показателем. В весенне-летний период на территории горных ландшафтов КФО на флаг собраны иксодиды 5 видов: *R. turanicus* (32,4%), *R. bursa* (18,9%), *H. punctata* (29,7%), *I. ricinus* (13,5%), *D. marginatus* (5,4%). Индекс обилия на 1 фл/км был низким (4,8). На учетчика за 1 час нападает в среднем 31 клещ, что является высоким показателем для этого времени года.

В осенний период в степных ландшафтах КФО индекс встречаемости иксодид на КРС составил 100%. Их видовой состав представлен 6 видами: имаго и нимфы *H. punctata* (35,6%), имаго *I. ricinus* (32,2%), имаго *D. marginatus* (16,7%), личинки и нимфы *R. bursa* (14,6%), имаго *D. reticulatus* (0,6%), имаго *H. marginatum* (0,3%). С диких мелких млекопитающих (насекомоядные и грызуны) собраны 3 вида иксодовых клещей: имаго и нимфы *H. punctata* (71,1%), имаго, личинки и нимфы *I. redikorzevi* (26,6%), имаго и нимфы *I. ricinus* (2,3%). Это соотношение особей разных видов иксодид характерно для осеннего периода.

При эпизоотологическом обследовании территории предгорий и горных ландшафтов в осенний период отмечено большее видовое разнообразие иксодид, чем весной на территории районов степной равнинной части Крыма, что связано с ландшафтно-климатическими особенностями местности.

В 2014 — 2015 гг. проведено лабораторное исследование 291 пула (2705 особей) иксодовых клещей методом ПЦР на наличие ДНК/РНК возбудителей КГЛ, ЛЗН, лихорадки Ку, КВЭ, КБ, КПЛ, ГАЧ, МЭЧ, туляремии. По данным нозологиям в 2014 г. установлено (количество исследованных пулов/количество положительных пулов): КГЛ (84/0), туляремия (62/0), лихорадка Ку (104/3), КБ (104/7), ГАЧ (104/31), КВЭ (104/0), МЭЧ (104/1), КПЛ (104/20), ЛЗН (0/0). По этим же нозологиям в 2015 г. (8 мес.): КГЛ (145/10), туляремия (249/12), лихорадка Ку (288/36), КБ (113/10), ГАЧ (104/31), КВЭ (173/0), МЭЧ (104/1), КПЛ (291/66), ЛЗН (17/0).

На наличие генетических фрагментов возбудителей КБ, ГЛПС и лептоспироза исследовано 283 пробы органов мелких млекопитающих. 16S рРНК возбудителя КБ обнаружена в 10 пробах печени мелких млекопитающих: мыши степной — 5 проб, мыши желтогорлой — 2, хомячка серого — 3; РНК хантавируса — в 1 пробе легких мыши степной; 16S рРНК лептоспир — в 12 пробах почек: мыши степной, мыши курганчиковой, ежа южного — по 1 пробе, полевки обыкновенной — 7, полевки общественной — 2.

Проведено молекулярно-генетическое типирование вируса ККГЛ, выявленного в 3 пробах суспензий клещей в 2015 г. Расшифрована нуклеотидная последовательность фрагментов S-, M- и L-сегментов генома. Филогенетический анализ секвенированных последовательностей показал принадлежность исследуемых образцов к генотипу Европа-1 (V), в пределах которого выделяется группа российских штаммов: подгруппы Ставрополь—Ростов—Астрахань (Va) и Волгоград—Ростов—Ставрополь (Vb), группа турецких штаммов, группа балканских штаммов и подгруппа Астрахань-2 (Vc). Образцы вируса ККГЛ из КФО в пределах генотипа Европа-1 не кластеризовались с ранее описанными группами и сформировали отдельный кластер на дереве, наиболее близкий к штаммам генотипа Астрахань-2 (Vc) при исследовании по S-сегменту, штаммам балканской подгруппы — по M-сегменту, группе российских штаммов — по L-сегменту. Процент нуклеотидных различий между образцами, принадлежащими к генотипу Европа-1 и образцами вируса ККГЛ, циркулирующими в КФО, по S-, M- и L-сегментам составил 2,5 — 5,5, что позволяет выделить исследуемые образцы в новую группу в пределах генотипа Европа-1.

Проведено молекулярно-генетическое типирование методом MLST возбудителей риккетсиозов (*Rickettsia* sp.), обнаруженных в 15 пробах суспензий клещей. Выполнено секвенирование фрагментов 6 генов (17 kDa, atpA, dnaK, gltA, ompA,

отрВ) для 15 образцов. Сравнение секвенированных участков с последовательностями из базы данных GenBank с использованием алгоритма BLAST показало их сходство с фрагментами генома *R. aeschlimanii* и *R. sibirica*. По результатам молекулярно-генетического анализа в 8 пробах выявлена *R. aeschlimanii*, принадлежащая к генетической группе риккетсий *R. massiliae* с неустановленными для человека свойствами патогенности, в 7 пробах — *R. sibirica*, являющаяся возбудителем клещевого сыпного тифа северной Азии и принадлежащая к генетической группе риккетсий *R. rickettsii*.

Таким образом, эпизоотологическое обследование позволило установить, что на территории КФО весной доминирующим видом иксодид является *H. marginatum*, мелких млекопитающих — мышь домовая. Осенью в сборах преобладают *Haemaphysalis punctata* и полевка обыкновенная. Методом молекулярно-генетического исследования выявлены маркеры 9 нозологических форм ПОИ: лихорадки Ку, КПЛ, КБ, ГАЧ, МЭЧ, ГЛПС, ЛЗН, туляремии и лептоспироза, что свидетельствует об эпизоотической активности природных очагов этих инфекций.

ОБСУЖДЕНИЕ

В системе эпидемиологического надзора Российской Федерации важное место отведено мониторингу заболеваемости и эпизоотологической активности природных очагов опасных трансмиссивных и зоонозных инфекций.

Проведенный эпидемиологический анализ заболеваемости природно-очаговыми инфекциями в Республике Крым и в городе федерального значения Севастополь показал, что в 2014 — 2015 (8 мес.) гг. регистрировались эпидемические проявления ПОИ по 6 нозологиям: клещевому боррелиозу (54 случая), марсельской лихорадке (28), лептоспирозу (6), туляремии (2), кишечному иерсиниозу (2) и клещевому вирусному энцефалиту (3).

Клещевые природно-очаговые инфекционные болезни являются одной из актуальных форм инфекционной патологии в мире. В Крымском федеральном округе регистрируются заболевания по 4 нозологическим формам таких болезней — КБ, КВЭ, марсельской лихорадке и туляремии, которые составили 91,6% от всего числа ПОИ. Наиболее высокая заболеваемость отмечена по КБ и марсельской лихорадке, причем по КБ в 2015 г. она повысилась на 20%.

Эпидемические проявления зоонозных ПОИ отмечены по кишечному иерсиниозу (2,1%) и лептоспирозу (6,3%). Заболеваемость кишечным иерсиниозом привлекает пристальное внимание органов здравоохранения и Роспотребнадзора, так как болезнь наносит значительный экономический ущерб и характеризуется тяжелым клиническим течением, возникновением рецидивов, трудностью клинической диагностики и возникновением групповых очагов. Лептоспироз занимает одно из ведущих мест среди зоонозов по распространенности его природных очагов в мире, тяжести клинического течения, частоте летальных исходов и отдаленных клинических последствий [Малецкая О.В. и др., 2015]. Летальные исходы при лептоспирозе регистрировались в КФО как в 2014 г. (66,7%), так и в 2015 г. (33,3%).

В результате эпизоотологического обследования территории Крымского федерального округа, проведенного в 2014 — 2015 гг., подтверждена активность природного очага КПЛ, впервые описанного в 1945 г. [3, 4]. Установлена циркуляция возбудителей лихорадки Ку, КПЛ, КБ, ГАЧ, МЭЧ, ГЛПС, ЛЗН, туляремии и лептоспироза, причем показатели численности носителей и переносчиков возбудителей этих природно-очаговых инфекций предполагают возможность возникновения эпидемических осложнений. Регистрация заболеваемости населения клещевым боррелиозом, марсельской лихорадкой, лептоспирозом, туляремией, кишечным иерсиниозом, клещевым вирусным энцефалитом также свидетельствует об активности природных очагов данных инфекций.

Для уверенного прогнозирования эпизоотической обстановки и оценки эпидемического риска по природно-очаговым инфекциям целесообразно определить точки долговременного наблюдения за численностью носителей и переносчиков природно-очаговых инфекций; усилить эпизоотологический контроль за террито-

рией, особенно в периоды сезонной активности носителей и переносчиков природно-очаговых трансмиссивных инфекций.

Медицинскому персоналу следует проявлять настороженность в отношении возникновения заболеваний; обеспечить готовность к проведению лабораторных исследований материала от больных, подозрительных на заболевание этими инфекционными болезнями, и больных с лихорадками неясного генеза, активизировать проведение информационно-разъяснительной работы среди населения по вопросам неспецифической профилактики и обеспечить проведение семинаров для медицинских работников по вопросам диагностики, клиники и профилактики природно-очаговых инфекционных болезней.

ЛИТЕРАТУРА

1. Павлинов И.Я., Лисовский А.А. Млекопитающие России: систематико-географический справочник. М., Т-во научн. изданий КМК, 2012.
2. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Шапошникова Л.И., Евстафьев И.Л., Товпинец Н.Н. и др. Эпизоотическая ситуация в Крымском Федеральном округе по результатам обследования в 2014 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2015, 2: 33-36.
3. Смирнова С.Е. Крымская-Конго геморрагическая лихорадка (этиология, эпидемиология, лабораторная диагностика). М., АТиСО, 2007.
4. Чумаков М.П. Новая вирусная клещевая болезнь — геморрагическая лихорадка в Крыму (острый инфекционный капилляро-токсикоз). В: Крымская геморрагическая лихорадка (острый инфекционный капилляро-токсикоз). Изд-во Отдельной приморской армии, 1945, с. 13-43.

Поступила 10.10.15

Контактная информация: Василенко Надежда Филипповна, д.б.н., проф., 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15, р.т. (8652)26-03-83

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

О.В.Малецкая¹, А.Г.Тиболов², Д.А.Прислегина¹, Г.К.Газиева², Н.И.Отараева², А.С.Волынкина¹, В.Н.Савельев¹, Г.И.Лямкин¹, А.А.Зайцев¹, А.Н.Куличенко¹

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВСПЫШКИ НОРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В РЕСПУБЛИКЕ СЕВЕРНАЯ ОСЕТИЯ-АЛАНИЯ

¹Ставропольский противочумный институт, ²Управление Роспотребнадзора по Республике Северная Осетия-Алания, Владикавказ

Цель. Анализ эпидемиологических особенностей вспышки норовирусной инфекции в г. Алагире Республики Северной Осетии-Алания и эффективности мероприятий по ее ликвидации. *Материалы и методы.* В работе были использованы данные карт-схем систем водоснабжения г. Алагира и статистической документации Центра гигиены и эпидемиологии в Республике Северная Осетия-Алания. Индикацию норовируса в образцах клинического материала и пробах воды проводили методом полимеразной цепной реакции. *Результаты.* Установлен этиологический агент вспышечного заболевания — норовирус генотипа II. Выявлена реализация фекально-орального механизма водного пути передачи возбудителя норовирусной инфекции. Определены условия, способствовавшие возникновению и развитию указанной вспышки — неудовлетворительное санитарно-техническое состояние системы водоснабжения города. *Заключение.* Исследуемая водная вспышка норовирусной инфекции была вызвана генотипом вируса GI.17, который в настоящее

время постепенно вытесняет генотип GII.IV, и характеризовалась интенсивным началом, вовлечением в эпидемический процесс всех возрастных групп населения (с преимущественным поражением взрослых), низкой семейной очаговостью, преобладанием в клинической картине форм болезни средней тяжести. Проведенные противоэпидемические мероприятия обеспечили быструю локализацию и ликвидацию вспышки норовирусной инфекции.

Журн. микробиол., 2016, № 2, С. 69—74

Ключевые слова: норовирусная инфекция, эпидемическая вспышка, водный путь передачи возбудителя, противоэпидемические мероприятия

O.V.Maletskaya¹, A.G.Tibilov², D.A.Prislegina¹, G.K.Gazieva², N.I.Otaraeva², A.S.Volynkina¹, V.N.Saveliev¹, G.I.Lyamkin¹, A.A.Zaitsev¹, A.N.Kulichenko¹

EPIDEMIOLOGIC FEATURES OF NOROVIRUS INFECTION OUTBREAK IN THE REPUBLIC OF NORTH OSSETIA-ALANIA

¹Stavropol Institute for Plague Control, ²Administration of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights' Protection and Human Well-being for the Republic of North Ossetia-Alania, Vladikavkaz, Russia

Aim. Analysis of epidemiologic features of a norovirus outbreak in Alagir city of the Republic of North Ossetia-Alania and effectiveness of measures of its liquidation. *Materials and methods.* Data from maps-schemes of water supply system of Alagir city and statistical documentation of Centre of Hygiene and Epidemiology in the Republic of North Ossetia-Alania were used in the study. Indication of norovirus in clinical material and water samples was carried out by polymerase chain reaction method. *Results.* Etiological agent of outbreak disease was established — genotype II norovirus. Realization of fecal-oral mechanisms of water transmission pathway of the causative agent of norovirus infection was detected. Conditions facilitating emergence and development of the indicated outbreak were determined — non-satisfactory sanitary-technical condition of water supply system of the city. *Conclusion.* The studied water outbreak of norovirus infection was caused by GII.17 genotype virus, that currently gradually displaces GII.IV genotype, and was characterized by an intensive start, involvement of all population age groups into the epidemic process (with primary infection of adults), low family focality, predominance of average severity disease forms in the clinical presentation. The counter-epidemic measures carried out ensured rapid localization and liquidation of the norovirus infection outbreak.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 2, P. 69—74

Key words: norovirus infection, epidemic outbreak, water pathway of causative agent transmission, counter-epidemic measures

Острые кишечные инфекции (ОКИ) до настоящего времени остаются актуальной проблемой здравоохранения и продолжают занимать одно из ведущих мест в структуре инфекционных болезней. За последние десять лет в Российской Федерации отмечается тенденция к увеличению числа регистрируемых случаев ОКИ (показатель заболеваемости в 2014 г. составил 87,7 на 100 тыс.), среди которых значительный удельный вес приходится на норовирусную инфекцию (уровень заболеваемости в 2014 г. по сравнению с 2013 г. повысился на 21,4%). Официальная регистрация гастроэнтеритов, вызванных вирусом Норволк, в Российской Федерации введена с 2009 г., показатель заболеваемости ОКИ, обусловленных норовирусами, в 2014 г. составил 8,91 на 100 тыс. населения [2].

На протяжении последних лет в РСО-Алания сохраняется неустойчивая эпидемиологическая обстановка по ОКИ (показатели заболеваемости за период 2011 — 2013 гг. составили 59,4 — 77,5 на 100 тыс. населения). Регистрация норовирусной инфекции в Республике введена с 2013 г. в связи с внедрением в регионе методов лабораторной

диагностики данной патологии. При анализе нозологической структуры ОКИ (2013 г.) в РСО-Алания установлено превалирование заболеваний вирусной этиологии (77,1%), среди которых значительная доля (19,6%) представлена гастроэнтеритами, вызванными вирусом Норволк. Все случаи норовирусной инфекции в Республике диагностировались у детей [1].

С начала 2015 г. в РСО-Алании отмечен рост заболеваемости ОКИ на 11,3%. по сравнению с аналогичным 4-месячным периодом 2014 г. В июне 2015 г. в г. Алагире произошла вспышка ОКИ с регистрацией показателей заболеваемости на уровне 673,9 на 100 тыс. населения, превысившая среднемесячный многолетний показатель в 7 раз.

В работе были использованы данные карт-схем систем водоснабжения и основных водопроводных сетей г. Алагира, экстренных извещений и журнала регистрации больных с симптомами ОКИ, проживающих в г. Алагире, материалы справки об эпидемиологической ситуации по острой кишечной инфекции в г. Алагире в июне 2015 г., Государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Республике Северная Осетия-Алания в 2013 году». Эпидемиологический анализ проводили классическими методами [3, 8] в соответствии с [6, 7]. Контроль качества воды водоводов и сети городского водопровода осуществляли в соответствии с [4]. Индикацию норовируса в образцах клинического материала и пробах воды проводили методом ПЦР с использованием тест-системы «АмплиСенс ОКИ скрин-FL» (ИнтерЛабСервис, Москва) в соответствии с [5].

По данным Центра гигиены и эпидемиологии в РСО-Алания, возникновение множественных случаев заболеваний ОКИ у жителей г. Алагира выявлено 08.06.2015 г. В последующие трое суток отмечалась максимальная регистрация пострадавших. Эпидемиологическая обстановка, сложившаяся к 11.06.2015 г., характеризовалась следующими особенностями: в короткий период времени (с 08.06. по 10.06.2015 г.) с проявлениями интоксикационного и гастроэнтерического синдромов за медицинской помощью обратился 791 человек, в том числе 298 (37,7%) детей в возрасте до 17 лет.

Эпидемиологический анализ показал, что большинство пострадавших отмечали употребление некипяченой водопроводной воды. Очаги заболевания возникли одновременно в различных районах города, при этом выявлено преобладание очагов с одним случаем заболевания (93%), доля очагов с двумя случаями составила 3%, единично отмечались множественные очаги (3 — 5 случаев). Учитывая данные эпидемиологического анамнеза пациентов, низкий уровень семейной очаговости заболевания, а также вовлеченность в эпидемический процесс всех возрастных категорий населения, за исключением детей первого года жизни (находящихся на естественном вскармливании), предположили водный путь передачи этиологического агента возникшей вспышки.

Подача питьевой воды в г. Алагир осуществляется из группового скважинного водозабора «Южный», Гусаринского каптажного группового водозабора и Цахцадыкомского каптажного водозабора. Водозабор «Южный», состоящий из 11 скважин, из которых 8 находятся в эксплуатации, имеет тесную гидравлическую связь с рекой Ардон. Проект зоны санитарной охраны (ЗСО) для указанного водозабора не разработан. Территория первого пояса ЗСО выделена, но не благоустроена. Скважины № 8, 3 не имеют павильонов, вокруг оголовков отсутствует твердое покрытие. Павильон скважины № 5 находится в аварийном состоянии. Санитарно-эпидемиологическое заключение на использование источника в целях питьевого и хозяйственно-бытового водоснабжения отсутствует. Городская водопроводная сеть введена в эксплуатацию еще в начале прошлого столетия, на настоящий момент нуждается в капитальной реконструкции и замене. Сетью централизованной канализации оборудовано 80% территории города.

Установлено, что в г. Алагире за два дня до начала вспышки ОКИ проводились

работы по замене водопроводной трубы протяженностью 100 м. Документального подтверждения о промывке и дезинфекции воды не представлено.

Результаты лабораторного исследования проб питьевой воды, отобранных из источников водоснабжения и разводящей городской сети и близлежащих сельских населенных пунктов, свидетельствовали о загрязнении воды, поступающей из водозабора «Южный», по микробиологическим показателям.

В процессе эпидемиологического расследования выявлен сброс сточных вод без очистки и обеззараживания в р. Ардон из двух населенных пунктов с неудовлетворительным санитарно-техническим состоянием канализационных сооружений и локальных очистных систем — пос. Мизура и с. Тамиск, расположенных выше по течению от скважинного водозабора «Южный» на 27 км и 3 км соответственно. Стоки очистных сооружений г. Алагир, находящихся на капитальном ремонте, сбрасываются в реку ниже по течению от указанного водозабора на 10 км.

При проведении лабораторного исследования на ОКИ проб воды реки Ардон, взятой в точке на 1 км выше водозабора «Южный», с использованием метода ПЦР обнаружены РНК норовируса II генотипа.

На основании проведенного эпидемиологического анализа и лабораторного исследования клинического материала от пострадавших и проб воды определены причинно-следственные связи в формировании вспышки норовирусной инфекции. Выявлен очевидный путь попадания вируса Норволк в водопроводную воду г. Алагир — со сточными водами в р. Ардон и далее через гидравлическую связь в водозабор «Южный». Неудовлетворительное состояние гидротехнических систем и отсутствие должного контроля качества питьевой воды способствовали возникновению и развитию вспышки ОКИ. Заражение людей происходило при реализации фекально-орального механизма водным путем передачи возбудителя. Фактором передачи вируса Норволк послужило употребление населением сырой воды.

С целью прекращения действия водного пути передачи возбудителя норовирусной инфекции был проведен комплекс санитарно-гигиенических и ремонтно-технических мероприятий. Скважины водозабора «Южный» оборудованы установками для капельного (временного) обеззараживания воды. На площадке резервуара введена в эксплуатацию новая электролизная установка производства раствора гипохлорита натрия «Электрохлор», и начато обеззараживание питьевой воды, поступающей в резервуар 2000 м³, с проведением на всех этапах процесса ежедневного лабораторного контроля воды на остаточный хлор, содержание которого в водопроводной воде поддерживалось на уровне 0,3 — 0,4 мг/л на выходе с водозаборных сооружений. Организовано круглосуточное видеонаблюдение за территориями водозаборов Алагирского района, на объектах водозабора «Южный» осуществляется ведомственная охрана.

С целью полного и раннего выявления больных ОКИ, проведения информационно-разъяснительной работы среди населения по вопросам профилактики норовирусной инфекции и предупреждения контактно-бытового пути распространения данного заболевания были проведены подворные обходы с привлечением интернов и студентов Северо-Осетинской медицинской академии. Распространялась памятка по профилактике норовирусной инфекции, в которой были даны рекомендации по недопущению использования некипяченой воды в бытовых и хозяйственных целях (умывание, мытье рук и посуды и пр.), обязательном использовании для питьевых нужд бутилированной воды, а также о строгом соблюдении правил личной гигиены.

За весь период вспышки норовирусной инфекции (с 08.06 по 24.06.2015 г.) зарегистрировано 1110 пострадавших (5,5% населения г. Алагир), из которых 490 человек (44,1% заболевших) были госпитализированы.

При анализе возрастной структуры больных отмечено преобладание взрослого населения, доля которого составила 67%. В указанной категории преимущественно болели лица трудоспособного возраста (72,5%). Дети до 17 лет составили 33% по-

страдавших. В структуре детской заболеваемости имело место преимущественное поражение детей школьной возрастной группы (73%), на долю детей раннего возраста (до 2 лет) пришлось 9%. Среди заболевших детей дошкольного и дошкольно-го возрастов организованные дети составили 33%.

Клиническое течение норовирусной инфекции у большинства больных (96,2%) наблюдали в форме средней тяжести, доля пациентов с легким течением болезни составила 3,8%, тяжелых случаев заболевания выявлено не было.

При проведении лабораторных исследований в пробах клинического материала была обнаружена РНК норовируса II генотипа.

С целью изучения и характеристики этиологического агента вспышки на базе Ставропольского противочумного института было проведено его молекулярно-генетическое типирование. Определена нуклеотидная последовательность фрагмента белка нуклеокапсида размером 302 п.н. норовируса II генотипа из 34 образцов клинического материала от больных. На основании анализа результатов установлена абсолютная идентичность вируса Норволк во всех исследованных образцах, что свидетельствует о наличии единого источника инфекции. Сравнение полученных нуклеотидных последовательностей норовируса с имеющимися в базах данных GenBank и NogoNET позволило определить его принадлежность к генотипу GII.17, который в настоящее время постепенно вытесняет доминировавший ранее в мире генотип GII. IV. Вирус Норволк, принадлежащий к генотипу GII.17, зимой 2014 — 2015 г. впервые вызвал ряд крупных вспышек в Китае (провинция Гуадун), Кении, а также был причиной спорадической заболеваемости норовирусной инфекцией в США и Гонконге. В Российской Федерации первая вспышка ОКИ, вызванная данным генотипом норовируса, зарегистрирована в п. Заветы Ильича Советско-Гаванского р-на Хабаровского края (март—апрель 2015 г.).

На основании полученных данных для предупреждения возникновения вспышек норовирусной инфекции и ОКИ, реализуемых водным путем передачи, стабилизации эпидемиологической обстановки в Республике было рекомендовано обеспечить: своевременное проведение ремонтно-профилактических работ на водопроводно-канализационных сооружениях; обустройство зон санитарной охраны источников водоснабжения; регулярное проведение производственного лабораторного контроля качества воды водопроводных сетей и источников.

Возникшая эпидемическая вспышка норовирусной инфекции в г. Алагире РСО-Алания характеризовалась интенсивным началом с возникновением множественных случаев гастроэнтерита среди всех возрастных групп населения города. Отмечено преимущественное поражение взрослых. Ранее случаи норовирусной инфекции в Республике выявлялись исключительно у детей до 17 лет. Эпидемический процесс характеризовался низкой очаговостью в семьях (в значительном большинстве преобладали очаги с одним случаем заболевания). Заражение людей происходило при реализации фекально-орального механизма водного пути передачи норовируса. Возникновению массовых случаев гастроэнтеритов, вызванных вирусом Норволк, предшествовал фоновый подъем заболеваемости ОКИ в РСО-Алания.

В результате эпидемиологического расследования установлено, что причиной формирования вспышки явилось загрязнение сточными водами р. Ардон и водозабора «Южный» с последующим поступлением инфицированной воды в водопроводную сеть. Ухудшению ситуации способствовали неправильная организация дезинфекционных мероприятий после проведенных ремонтных работ водопроводной трубы и в целом неудовлетворительное санитарно-техническое состояние системы водоснабжения города Алагира.

Проведенные противоэпидемические мероприятия, направленные на устранение выявленного пути передачи вируса Норволк, обеспечили быстрое снижение заболеваемости и ликвидацию исследуемой вспышки.

Для предупреждения возникновения вспышек норовирусной инфекции и других

ОКИ, реализуемых водным путем передачи возбудителей, в Республике необходимы организация и обеспечение системного санитарно-эпидемиологического наблюдения за состоянием системы водоснабжения, микробиологическими показателями исходной и питьевой воды, а также проведение текущего мониторинга с целью прогнозирования возможного ухудшения эпидемиологической обстановки и своевременного принятия необходимых профилактических мер.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Республике Северная Осетия — Алания в 2013 году».
2. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2014 году».
3. Зуева Л.П., Яфаев Р.Х. Эпидемиология. СПб., Фолиант, 2006.
4. Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества. Гигиенические требования к обеспечению безопасности систем горячего водоснабжения. СанПиН 2.1.4.1074-01, Утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 7 апреля 2009 г. № 20.
5. Порядок применения молекулярно-генетических методов при обследовании очагов острых кишечных инфекций с групповой заболеваемостью. Методические указания. МУК 4.2.2746-10.
6. Профилактика инфекционных болезней. Кишечные инфекции. Эпидемиологический надзор, лабораторная диагностика и профилактика норовирусной инфекции. Методические указания. МУ 3.1.1.2969-11.
7. Профилактика острых кишечных инфекций. Санитарно-эпидемиологические правила. СП 3.1.1.3108-13.
8. Черкасский Б.Л. Руководство по общей эпидемиологии. М., Медицина, 2001.

Поступила 08.10.15

Контактная информация: Малецкая Ольга Викторовна, д.м.н., проф.,
355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15, р.т. (8652)26-03-83

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

Л.И.Жукова¹, Г.К.Рафеенко², В.Н.Городин¹, А.А.Ванюков³

КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИХОРАДКИ ЗАПАДНОГО НИЛА В КРАСНОДАРСКОМ КРАЕ

¹Кубанский государственный медицинский университет, ²Центр гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае, ³Специализированная клиническая инфекционная больница Краснодарского края, Краснодар

Цель. Клинико-эпидемиологическая характеристика лихорадки Западного Нила (ЛЗН) на территории Краснодарского края в многолетней динамике. *Материалы и методы.* Ретроспективно проанализированы проявления эпидемического процесса и клинических симптомов ЛЗН с 1988 по 2013 гг. на территории Краснодарского края. Используются результаты эпидемиологических наблюдений с включением мониторинга циркуляции арбовирусов, проводимых Причерноморской противочумной станцией и Центром гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае. Клиническое течение верифицированной ЛЗН изучено у 62 пациентов, лечившихся в Специализированной клинической инфекционной больнице Краснодара в 1999 — 2012 годах. *Результаты.* Представлена клинико-эпидемиологическая характеристика случаев заболеваемости ЛЗН на территории Краснодарского края. Отмечено наличие действующих очагов арбовирусных инфекций, установлены клинические признаки заболевания, выделены группы пациентов, требующих обследования на ЛЗН. *Заключение.* Определен комплекс энтомолого-вирусологического мониторинга, профилактических и противоэпидемических мероприятий, которые

позволят предотвратить возникновение опасных эпидемиологических проявлений очагов заболевания в будущем.

Журн. микробиол., 2016, № 2, С. 74—80

Ключевые слова: лихорадка Западного Нила, заболеваемость, клинические признаки, эпидемиологический мониторинг

L.I.Zhukova¹, G.K.Rafeenko², V.N.Gorodin¹, A.A.Vanyukov³

CLINICAL-EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERISTIC OF WEST NILE FEVER IN KRASNODAR REGION

¹Kuban State Medical University, ²Centre of Hygiene and Epidemiology in Krasnodar Region, ³Specialized Clinical Infectious Hospital of Krasnodar Region, Krasnodar, Russia

Aim. Clinical-epidemiological characteristic of West Nile fever on the territory of Krasnodar Region in multi-year dynamics. *Materials and methods.* Manifestations of epidemic process and clinical symptoms of West Nile fever (WNF) on the territory of Krasnodar Region were analyzed retrospectively from 1988 to 2013. Results of epidemiologic observations with inclusion of monitoring of arbovirus circulation, carried out by Prichernomorskaya Station of Plague Control and Centre of Hygiene and Epidemiology in Krasnodar Region were used. Clinical course of verified WNF was studied in 62 patients, treated in the Specialized Clinical Infectious Hospital of Krasnodar in 1999 — 2012. *Results.* Clinical-epidemiologic characteristic of cases of West Nile fever morbidity on the territory of Krasnodar Region is presented. The presence of acting foci of arbovirus infections was noted. Clinical signs of the disease are established, patients allocated into groups that require examination for West Nile fever. *Conclusion.* Complex of entomologic-virologic monitoring, prophylactic and counter-epidemic measures was determined, that allow to prevent emergence of dangerous epidemiologic manifestations of foci of the disease in the future.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 2, P. 74—80

Key words: West Nile fever, morbidity, clinical signs, epidemiologic monitoring

В последние двадцать лет в Европе отмечается увеличение частоты регистрации экзотических для данных регионов арбовирусных лихорадок — Денге, желтой, Синдбис, Чикугунья, а также лихорадки Западного Нила (ЛЗН) [10]. Вспышки ЛЗН отмечены в Румынии, Чехии и Италии, заболеваемость ЛЗН отмечается в большинстве стран СНГ [3, 7, 8, 10]. В Российской Федерации первая крупная трансмиссивная вспышка ЛЗН была зарегистрирована в южных регионах страны в 1999 году, когда в течение летних месяцев заболели около 600 человек в Волгоградской, Астраханской и Ростовской областях [1, 4, 5]. В последующие годы на перечисленных территориях РФ случаи ЛЗН регистрируют постоянно [8]. По данным многолетнего обследования людей, комаров, клещей, птиц, сельскохозяйственных животных был выделен эпидемический центр ЛЗН в России, который располагается в антропогенных биоценозах среднего пояса дельты Волги.

Эпидемиологическую составляющую проблемы ЛЗН обусловила эпизоотическая активность природных очагов арбовирусных инфекций с трансмиссивным путем передачи возбудителя [10]. По-видимому, наряду с естественной миграцией перелетных птиц активизации природных очагов способствовало повышение плотности популяций синантропных и орнитофильных комаров, иксодовых клещей и их прокормителей, связанное с глобальным потеплением климата [2, 9, 10].

Не вызывает сомнений, что истинная заболеваемость лихорадкой Западного Нила значительно превосходит регистрируемую. Считается, что клинически выраженные формы ЛЗН составляют менее 1% от общего числа инфицированных вирусом [8, 11].

Сходство клинических проявлений ЛЗН с другими арбовирусными лихорадками определяет сложность клинической диагностики, которая порой связана с отсутствием настороженности и недостатком врачебных знаний в отношении данного заболевания.

Целью нашего исследования явилась клинико-эпидемиологическая характеристика лихорадки Западного Нила на территории Краснодарского края в многолетней динамике.

Использованы результаты эпидемиологических наблюдений с включением мониторинга циркуляции арбовирусов, проводимых Причерноморской противочумной станции и Центром гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае. Клиническое течение верифицированной лихорадки Западного Нила изучено у 62 пациентов, лечившихся в Специализированной клинической инфекционной больнице Краснодара в 1999 — 2012 годах.

Природные очаги вируса лихорадки Западного Нила в Краснодарском крае впервые были выявлены в 1988 году при изучении циркуляции арбовирусов. Штаммы вируса ЛЗН были выделены от комаров *Culex modestus*, клещей *Dermacentor marginatus* из Отраденского района, а также из внутренних органов обыкновенной полевки, отловленной в Темрюкском районе. Отличительной особенностью выделенных штаммов были различия в антигенной структуре и геноме с типичными штаммами вируса ЛЗН, что позволило определить их как новый 4 генотип вируса. В последующем у разных видов диких грызунов на территории Краснодарского края также были обнаружены антигены вируса ЛЗН, которые при идентификации методом биопроб на мышцах-сосунках по общепринятым методикам были отнесены к трем штаммам вируса ЛЗН [9].

Видовой состав переносчиков, отловленных для лабораторного исследования в 2010 году, был представлен в г. Краснодар комарами *C.p.molestus*, а в Крыловском районе Краснодарского края — комарами *C.p.ripriens*. При исследовании 148 экземпляров имаго комаров методом ПЦР с использованием тест-системы «АмплиСенс WNV-FL» в лаборатории Центра гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае РНК вируса ЛЗН ни в одном случае не была обнаружена.

Следует отметить также, что в 2006 — 2007 гг. сотрудниками института вирусологии им. Д.И.Ивановского (Москва) в Темрюкском районе Краснодарского края проводилось комплексное серологическое исследование биотической среды на предмет циркуляции арбовирусных инфекций. Среди обследованных людей антитела к вирусу ЛЗН в сыворотках крови методом ИФА были обнаружены в 11,7% случаев, методом РН — в 3,3%, методом РТГА — в 5,3%. У сельскохозяйственных животных положительными на наличие антител к ЛЗН методом ИФА оказались 11,1% сывороток, методом РТГА — 22,2%. Результаты исследования продемонстрировали наличие иммунной прослойки против вируса ЛЗН у жителей Темрюкского района, соответствующей циркуляции вируса среди сельскохозяйственных животных (лошадей, крупного рогатого скота) и диких птиц (цапель и лысух) [6].

Первые случаи заболевания лихорадкой Западного Нила среди госпитализированных в Специализированную клиническую инфекционную больницу г. Краснодар были зарегистрированы в 1999 году, в то же время, официальная регистрация данного заболевания началась в 2010 году. За период 2010 — 2013 гг. в Краснодарском крае зарегистрировано 13 случаев лихорадки Западного Нила, интенсивный показатель заболеваемости ЛЗН в Краснодарском крае в 2010 году составил 0,06 на 100 000 населения, в 2011 году — 0,14, в 2012 году — 0,06, в 2013 — 0. У всех больных диагноз был установлен после обнаружения специфических IgM и IgG к вирусу ЛЗН методом ИФА.

Большинство обследованных пациентов были жителями Краснодара (91,9%) или Краснодарского края (6,5%), реже — отдыхающими в крае приезжими (1,6%). Пик

заболеваемости наблюдался в августе (29 — 46,7% случаев) и сентябре (24 — 38,7% случаев).

По данным эпидемиологического расследования все заболевшие отмечали укусы комаров, в том числе, и при выезде в природные биотопы. Многие из пострадавших участвовали в рыбной ловле в районах лиманно-плавневой ландшафтно-климатической зоны Краснодарского края и Ростовской области, которые являются местом обитания большого количества водоплавающих птиц и орнитофильных комаров.

Возможность инфицирования больных при посещении ими этих биотопов не вызывает сомнения, принимая во внимание высокую численность кровососущих комаров в эпидемический сезон 2010 года, а также высокую вероятность трансмиссии вируса Западного Нила от водоплавающих птиц комарам.

Средний возраст госпитализированных больных составил $52,5 \pm 2,2$ лет, при этом большинство пациентов относились к старшим возрастным группам. Превалировали женщины (40 — 64,5%), мужчин было 22 (35,5%).

В направительных диагнозах врачами лечебно-профилактических учреждений наиболее часто значились неуточненный менингит — 35 (56,5%), лихорадка неясного генеза — 13 (21,0%), острая респираторная инфекция — 11 (17,7%). Среди клинических форм лихорадки Западного Нила в заключительных диагнозах превалировали формы с поражением центральной нервной системы. Так, у 51 (82,3%) из 62 больных был диагностирован менингит, у 7 (11,3%) — менингоэнцефалит, и только у 4 (6,5%) пациентов лихорадка Западного Нила протекала без признаков поражения центральной нервной системы. В 17 (27,4%) случаев отмечалось тяжелое течение болезни, в 45 (72,6%) — среднетяжелое.

Больные поступали на стационарное лечение на 1 — 17 (в среднем $6,9 \pm 0,5$) день болезни. Большинство пациентов (48 — 77,4%) госпитализировались позднее третьего дня заболевания. Так, например, больному Е. диагноз ЛЗН был установлен 13.10.10, то есть на 15 день со дня обращения за медицинской помощью. В анамнезе Е. 18.09.10 подвергся укусу комара на рыбалке в лимане в районе Азовского моря, после чего вокруг укуса возникла сопровождающаяся зудом гиперемия, с 24.09.10 появились озноб, повышение температуры тела до 39°C . К участковому врачу пациент обратился 28.09.10, после чего был госпитализирован с диагнозом острый лимфаденит.

Больная К. заболела остро 07.09.12 с повышения температуры до фебрильных значений, рвоты и болей в животе. 08.09.12 госпитализирована в хирургическое отделение Красноармейской ЦРБ с диагнозом хронический панкреатит, обострение. Из эпиданамнеза — укусы комаров в течение всего летнего сезона. Неврологическая симптоматика появилась 09.09.12. После консультации невролога 10.09.12 пациентка была переведена в терапевтическое отделение с диагнозом острое нарушение мозгового кровообращения. По результатам компьютерной томографии головного мозга диагностированы атеросклеротические изменения сосудов головного мозга. Состояние продолжало ухудшаться. В связи с усилением неврологической симптоматики и сохраняющейся лихорадки 13.09.12 пациентка была переведена в реанимационное отделение с диагнозом лихорадка неясной этиологии, менингизм. Врачебный консилиум, который состоялся 14.09.12, высказал предположение о возможности у больной ЛЗН, были проведены ИФА и ПЦР, выявлены специфические IgG и IgM. Таким образом, диагноз лихорадка Западного Нила после получения результатов исследования был установлен на 10 день госпитализации.

Больной Д. заболел 05.09.10, за медицинской помощью в городскую поликлинику обратился 08.09.10 с жалобами на повышение температуры до 39°C . Пациенту был поставлен диагноз острый бронхит, назначены антибиотики. Состояние не улучшалось, 13.09.10 появился тремор рук, 16.09.10 — нарушение речи, 18.09.10 — нарушение сознания. Госпитализирован 18.09.10 в реанимационное отделение СКИБ Краснодара

в крайне тяжелом состоянии с признаками менингоэнцефалита, пневмонии, дыхательной недостаточности. Диагноз ЛЗН поставлен 21.09.10, то есть на 10 день со дня обращения за медицинской помощью.

У всех госпитализированных и наблюдаемых нами пациентов заболевание протекало на фоне повышения температуры тела, у большинства 37 чел (59,7%) до фебрильных значений. В остальных случаях отмечался субфебрилитет. Повышение температуры продолжалось от 1 до 24 дней, составив в среднем $19,6 \pm 1,6$ суток. У половины больных отмечалась вторая волна повышения температуры. Слабость сопровождала температурную реакцию у 61 (98,4%) пациента, головная боль — у 59 (95,2%), озноб — у 28 (45,2%), боли в суставах — у 10 (16,1%), мышечные боли — у 8 (12,9%).

У 45 (72,6%) больных отмечались выраженные менингеальные знаки — ригидность мышц затылка и симптом Кернига, у 17 (27,4%) пациентов обнаруживали очаговые симптомы поражения головного мозга в виде нарушения сознания, тремора, параспазма, параличей. Всем этим больным была проведена спинномозговая пункция, по результатам которой был диагностирован менингит (менингоэнцефалит).

В ряде случаев в остром периоде у больных выявляли преходящие интеллектуальные выпадения, у двух — интеллектуальные выпадения были стойкими, у одного больного наблюдалось агрессивное-депрессивное состояние с идеями суицида, у одного — абсанция, диплопия, правосторонняя парестезия, снижение рефлексов справа, патологические кистевые рефлексы, у одного — патологические кистевые рефлексы и мышечная слабость в правой руке, у одного — правосторонний блефароптоз, общий мышечный гипертонус, гиперрефлексия, рефлексы орального автоматизма, у одного — стойкий горизонтальный нистагм. Наиболее часто эти симптомы манифестировали с 5 по 9 день заболевания и сохранялись от 10 до 32 суток.

Исследование спинномозговой жидкости было проведено 58 (93,5%) больным. При этом в 39 (67,2%) случаях ликвор был серозным, а в остальных — гнойным.

Признаки поражения дыхательных путей в виде гиперемии задней стенки глотки были диагностированы у 9 (14,5%) больных, ослабления дыхания в легких — у 18 (29,0%), жесткого дыхания в легких — у 16 (25,8%), хрипов в легких — у 15 (24,2%), кашля — у 4 (6,4%) и одышки — у 1 (1,6%).

Пятнистая и крупно-пятнистая экзантема на туловище и в одном случае на лице выявлена у 6 (9,7%) больных, из них у двух с 1 по 10 день болезни, а у четырех — с 11 по 19 день.

Гепатомегалия отмечена у 18 (29,0%) больных, спленомегалия — у 2 (3,2%) пациентов. Общая продолжительность заболевания колебалась от 10 до 53 дней, составив в среднем $27,4 \pm 1,5$ дня, средняя длительность госпитализации — $22,1 \pm 1,1$ койко-дня.

Среди наблюдаемых нами госпитализированных больных летальных исходов от лихорадки Западного Нила не было.

Полученные в ходе клинико-эпидемиологического наблюдения результаты исследования позволяют считать, что в Краснодарском крае существуют природные очаги арбовирусных инфекций, в том числе лихорадки Западного Нила. Это обязывает эпидемиологическую, энтомологическую и лечебно-профилактическую службы Краснодарского края к ряду действий, которые позволят предотвратить возникновение опасных эпидемиологических проявлений очагов ЛЗН в будущем. В частности, целесообразно исследование популяции комаров на инфицированность вирусом Западного Нила в природных биотопах Краснодарского края, что в совокупности с данными о численности переносчиков и сведениями о местах их возможного выплода определит риск заражения населения ЛЗН и границы очагов вируса. По результатам энтомологических исследований необходимо обеспечить комплекс дезинсекционных мероприятий и гидротехнических работ, направленных на снижение численности переносчиков вируса ЛЗН до уровня санитарно-эпидемиологического благополучия населения, предписываемого Федеральным законом. Для предотвра-

щения дальнейшего заболевания ЛЗН жителей городов Краснодарского края необходимо взаимодействие санитарной и коммунальной служб, направленное на улучшение санитарно-эпидемиологического состояния подвальных помещений и других искусственных мест выплода синантропных комаров.

Для выявления иммунной прослойки среди жителей Краснодарского края, проживающих в районах лиманно-плавневой зоны, необходимо организовать сбор и исследование сывороток крови на определение титра антител к вирусу ЛЗН и степени их авидности.

Клинической проблемой лихорадки Западного Нила является сложность в постановке диагноза, которая связана как с отсутствием патогномичных и опорных симптомов этого заболевания, так и с незнанием многих врачей о данной инфекции, что в наших наблюдениях демонстрирует частота ошибочных направительных диагнозов.

Как и для всей России [8], для Краснодарского края типично превалирование в структуре заболевших лихорадкой Западного Нила городских жителей мужского пола старших возрастных групп.

Важным, на наш взгляд, является низкий процент диагностированных случаев ЛЗН без поражения центральной нервной системы, составляющий всего 6,5%, что свидетельствует об ограничении в категориях обследованных на ЛЗН пациентов. В этой связи, целесообразно существенно расширить круг освидетельствования пациентов на ЛЗН, включив в него больных с неясными лихорадками, неясными экзантемами, нетипичными проявлениями острых респираторных заболеваний, особенно поступающих на стационарное лечение в летне-осенний период.

Таким образом, лихорадка Западного Нила на территории Краснодарского края требует продолжения и активизации противоэпидемических и профилактических мероприятий в связи с прогнозами возможного усугубления эпидемической ситуации, обусловленного риском завоза на территорию Европы более эффективного переносчика заболевания — комара нового варианта или подвида *C. pipiens* из Америки, отличающегося от уже существующих европейских разновидностей [10].

ЛИТЕРАТУРА

1. Айдинов Г.В., Кормиленко И.В., Гайбарян К.С. и др. Эпидемиология лихорадки Западного Нила в Ростовской области. Арбовирусы и арбовирусные инфекции. М., 2007: 115-120.
2. Бутенко Л.М. Лихорадка Западного Нила. Эволюция инфекционных болезней в России в XX веке. М., 2003.
3. Волкова Н.Н., Мусабаев Э.И., Шерматов В.А. и др. Лихорадка Западного Нила в Узбекистане. Инфекционные болезни. 2012, 10 (2): 26-28.
4. Джакетов А.Ф., Щелканов М.Ю., Львов Д.Н. и др. Мониторинг вируса Западного Нила на территории Астраханской области (1997-2005 гг.). Арбовирусы и арбовирусные инфекции. М., 2007: 136-139.
5. Красовская Т.Ю., Шарова И.Н., Найденова Е.В. и др. Формирование очага лихорадки Западного Нила на территории Саратовской области. Журн. микробиол. 2013, 5: 36-42.
6. Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Колобухина Л.В. и др. Серологический мониторинг арбовирусных инфекций в дельте реки Кубань. Вопросы вирусологии. М., 2008, 53: 30-35.
7. Малецкая О.В., Беляева А.И., Таран Т.В. и др. Эпидемиологическая обстановка по опасным инфекционным болезням на территории республики Абхазия. Журн. микробиол. 2013, 5: 43-47.
8. Онищенко Г.Г., Липницкий А.В., Алексеев В.В. и др. Эпидемическая ситуация по лихорадке Западного Нила в России в 2010 году. Журн. микробиол. 2011, 3: 115-120.
9. Пиликова О.М., Юничева Ю.В., Ларичев В.Ф. Изучение циркуляции арбовирусов на территории курируемой Причерноморской противочумной станцией. Арбовирусы и арбовирусные инфекции. М., 2007: 152-155.

10. Сергиев В.П., Ганушкина Л.А., Филатов Н.Н. Новые и возвращающиеся переносчики вирусных лихорадок — угроза эпидемических осложнений на юге Европы и России. Журн. микробиол. 2011, 4: 97-100.
11. Смелянский В.П., Алексеев В.В., Липницкий А.В. и др. Особенности клиники и эпидемиологии лихорадки Западного Нила в сезон 2010 г. в Волгоградской области. Инфекционные болезни. 2011, 9 (4): 75-78.

Поступила 16.10.15

Контактная информация: Жукова Лариса Ивановна, д.м.н., проф.,
350015, Краснодар, ул. Седина, 4, р.т. (861) 255-26-40

© М.Н.ГАПОН, Л.Н.ТЕРНОВСКАЯ, 2016

М.Н.Гапон, Л.Н.Терновская

ВЫЯВЛЕНИЕ СТЕПЕНИ МИКРОЭКОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ КИШЕЧНИКА НА ОСНОВЕ РАСЧЕТА ЛОКАЛЬНОГО АНТИОКСИДАНТНОГО ИНДЕКСА

Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии, Ростов-на-Дону

Цель. Оценка дисбиотического состояния кишечника на основе определения локального антиоксидантного индекса (ЛАИ). *Материалы и методы.* Обследованы 155 пациентов с бактериологически подтвержденным дисбактериозом кишечника. Контролем служили 20 человек с нормобиоценозом кишечника. Для биохимического исследования использовали разведение фекалий 10^{-2} . Активность каталазы, супероксиддисмутазы и уровень малонового диальдегида оценивали фотометрически по величине оптической плотности образцов. Микробный пейзаж фекалий исследовали бактериологическим методом с параллельным определением в образцах копрофильтратов активности указанных ферментов и содержания малонового диальдегида. Оценку нарушенной микроэкологии кишечника осуществляли биохимическим методом путем расчета локального антиоксидантного индекса в сопоставлении с данными микробных карт. *Результаты.* В копрофильтратах людей с нормобиоценозом кишечника показатель ЛАИ был значительно выше 20. У пациентов с выявленным дисбактериозом кишечника, в зависимости от его степени, регистрировали изменение показателя ЛАИ в диапазоне от отрицательного до 20. У части больных дисбактериоз носил пролонгированный характер, ЛАИ был ниже 14, что отражало наличие персистирующего воспаления. При назначении пробиотического препарата наблюдали тенденцию к нормализации микробной экологии и росту ЛАИ. *Заключение.* Предложен скрининговый критерий, дифференцирующий степень тяжести дисбактериоза кишечника на основе расчета локального антиоксидантного индекса.

Журн. микробиол., 2016, № 2, С. 80—84

Ключевые слова: дисбактериоз кишечника, локальный антиоксидантный индекс

M.N.Gapon, L.N.Ternovskaya

DETECTION OF DEGREE OF MICROECOLOGICAL DISTURBANCE OF INTESTINE BASED ON CALCULATION OF LOCAL ANTIOXIDANT INDEX

Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology, Rostov-on-Don, Russia

Aim. Evaluation of dysbiotic condition of intestine based on determination of local antioxidant index (LAI). *Materials and methods.* 155 patients with bacteriologically confirmed intestine dysbacteriosis were examined. 20 individuals with normobiocenosis of the intestine served as control. Feces dilution 10^{-2} was used for biochemical study. Catalase, superoxide dismutase activity and level of malonic dialdehyde was evaluated photometrically by the value of optical density of the samples. Microbial landscape of feces was studied by a bacteriologic method with parallel determination in samples of coprofiltrates of activity of the indicated enzymes and content of malonic

dialdehyde. Evaluation of disturbances of microecology of the intestine was carried out by a biochemical method by calculating local antioxidant index in juxtaposition with microbial map data. *Results.* LAI parameter was significantly higher than 20 in coprofiltrates of people with intestine normobiocenosis. In patients with detected intestine dysbacteriosis, depending on its degree, LAI parameter changes were registered in the range from negative to 20. Dysbacteriosis in a part of patients had a prolonged character, LAI was lower than 14, that reflected the presence of a persistent inflammation. A tendency of normalization of microbial ecology and growth of LAI was observed during administration of a probiotic preparation. *Conclusion.* A screening criteria is proposed, that differentiates the degree of severity of intestine dysbacteriosis based on calculation of local antioxidant index.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 2, P. 80—84

Key words: intestine dysbacteriosis, local antioxidant index

Учитывая глобальное распространение дисбактериоза кишечника (ДК) человека в РФ был разработан ОСТ «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» [7]. Согласно ему дисбактериоз кишечника подразделен на три степени. ДК I степени (латентная, компенсированная форма) характеризуется незначительными изменениями в аэробной части микробиоценоза, которые выражаются уменьшением или увеличением количества кишечной палочки с нормальной ферментативной активностью, изменением удельного веса кокковой флоры и некоторым снижением общего количества анаэробной флоры до нижних значений нормы. Кишечные дисфункции, как правило, не регистрируются. Если такая форма дисбактериоза отмечается после применения пробиотиков, то это свидетельствует об их нормализующем эффекте. ДК II степени (субкомпенсированная форма) сопровождается снижением концентрации основных представителей анаэробной флоры и количественными и качественными изменениями колибактериальной флоры, включая повышение численности условно патогенных микроорганизмов. Эта форма дисбактериоза характеризует пограничное состояние, поэтому обследуемого можно отнести к группе риска. Если указанные изменения микрофлоры выявлены на фоне лечения бактериальными препаратами, то можно думать о начавшемся восстановлении микробиоценоза кишечника. Целесообразно продолжить лечение пробиотическими препаратами до восстановления нормальной флоры даже в случае отсутствия явных клинических проявлений и дисфункций кишечника. ДК III степени характеризуется значительным снижением количества или практически полным отсутствием облигатных анаэробов, резким качественным и количественным изменением кишечной палочки и соотношений в составе аэробной микрофлоры, численным превосходством условно патогенных энтеробактерий, псевдомонад, кандид, стафилококков и их ассоциаций, что, как правило, сопровождается кишечными дисфункциями и деструктивными изменениями кишечной стенки. При таких состояниях необходимым является незамедлительное назначение пробиотиков и других средств для восстановления нормальной микрофлоры.

В настоящее время установлено, что ДК, характеризующийся изменением нормального состава микробиоценоза, является патогенетической основой липидного дистресс-синдрома, сахарного диабета 2 типа, ожирения и атеросклероза [1 — 3]. Диагностика ДК осуществляется, как правило, классическим бактериологическим методом длительным по времени. При этом важное значение имеет раннее выявление дисбактериоза с целью своевременного назначения пробиотической терапии [2]. Показана связь нарушения колонизационной резистентности толстой кишки с существенными изменениями в локальной антиоксидантной системе, приводящей к увеличению содержания в копрофильтратах токсических продуктов перекисного окисления липидов [4]. Известно, что окислительный стресс и нарушение в системе детоксикации лежат в основе всех патологических процессов, сопровождающихся

воспалительной реакцией. Поэтому очень важным является оценка антиоксидантного статуса организма. Для этого чаще всего определяют биохимические показатели в образцах сыворотки крови, мочи или слюны. Однако нами установлено, что для оценки локального антиоксидантного статуса при дисбактериозе кишечника более информативными являются данные, полученные при исследовании копрофильтратов.

Целью нашей работы явилась разработка способа определения тяжести дисбиотического состояния кишечного биотопа на основе расчета локального антиоксидантного индекса путем определения соотношения показателей активности супероксиддисмутазы и каталазы к содержанию малонового диальдегида в копрофильтратах.

Обследованы 155 пациентов с бактериологически подтвержденным дисбактериозом кишечника. Контрольную группу составили 20 добровольцев с относительным нормомикробиоценозом кишечника (в пределах I степени ДК) [7]. Для биохимического исследования использовали супернатанты фекалий пациентов в разведении 10^{-2} . Активность каталазы, супероксиддисмутазы (СОД), а также концентрацию малонового диальдегида (МДА) оценивали фотометрически по величине оптической плотности. Супернатанты фекалий получали путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 30 минут. Активность каталазы в копрофильтратах определяли по методу [5], выражая в мкат/г. Активность СОД определяли по методу [8], выражая данные в у.е./мл. Интенсивность ПОЛ оценивали по уровню вторичного продукта — малонового диальдегида, содержание которого определяли по методу [9], выражая количественное содержание МДА в копрофильтратах в нмоль/мл.

Оценку тяжести дисбиотического состояния биотопа осуществляли на основе расчета локального антиоксидантного индекса путем определения показателей активности ферментов СОД, каталазы и их соотношения с уровнем содержания МДА в образцах биоматериала. Расчет локального антиоксидантного индекса проводили по формуле: $ЛАИ = (\text{акт. СОД} \times \text{акт. каталазы}) : \text{кол-во МДА}$.

Состав полостной микрофлоры кишечника изучали в соответствии с [6]. Выделение и идентификацию чистых культур проводили по морфологическим, тинкториальным, культуральным, биохимическим признакам с помощью энтеро-, стафило-, нефермент- и анаэротестов (Lachema, Чехия). Степень дисбактериоза устанавливали согласно [7].

ЛАИ супернатантов фекалий практически здоровых добровольцев составлял от 20 и выше. При этом у лиц с нормальным показателем ЛАИ в кишечном биоценозе не происходили качественные и количественные изменения в популяции эшерихий, не встречались гемолитические энтерококки и золотистые стафилококки. Анализ микробных карт позволил выявить ДК I, II и III степени у 155 пациентов. Среди которых 7,3 % составляли лица с I степенью дисбактериоза и показателем ЛАИ в диапазоне от 14 до 20. Остальные 92,7 % обследованных имели II и III степень дисбактериоза. Важно отметить, что при изменениях микробного пейзажа соответствующие II субкомпенсированной степени значения ЛАИ могли также достигать 20. Лица с III и со II декомпенсированной степенью ДК имели значения ЛАИ от отрицательного до 14.

Таким образом, биохимические исследования показали, что рассчитываемый ЛАИ характеризуется дифференцирующей способностью в отношении определения тяжести дисбактериоза кишечника, позволяет оценить антиоксидантный статус контролируемого биотопа.

Среди 155 обследованных людей показатель ЛАИ находился в диапазоне от отрицательного до 20 у 97,3%, что свидетельствовало о нарушениях в локальной антиоксидантной защите организма и наличии персистирующего воспаления. При этом, в содержимом толстого кишечника отмечались однотипные изменения нормобиоценоза. Выявлялась условно патогенная микрофлора (УПМ) в ассоциациях на фоне снижения количества одного или нескольких эубионтов (бифидобактерий, лактоба-

цилл, типичных эшерхий). Наблюдалось высокое содержание эшерихий, наличие гемолитических энтерококков, повышенная относительно нормы численность кандид, кластридий. Обнаруживался золотистый стафилококк или высокое количество коагулазоотрицательных стафилококков. Напротив, при величине ЛАИ более 20 состояние локальной антиоксидантной защиты являлось стабильным и риск развития воспалительного процесса отсутствовал. В составе кишечного биоценоза могла присутствовать в незначительном количестве (<lg4) транзитная микрофлора (кластридии, лактозонегативные энтеробактерии и эшерихии), а численность одного из зубионтов располагаться на границе нормы. Количество типичных эшерихий находилось в пределах возрастных значений. Отсутствовали гемолитические энтерококки и золотистый стафилококк.

Высокая (от 83,2 до 100%) частота выявления микроорганизмов в количестве, не соответствующем норме, свидетельствует о достоверности показателя ЛАИ.

При исследовании супернатантов фекалий 55 пациентов с дисбактериозом, обусловленным разными причинами, которые наряду со специфическим лечением принимали кисломолочный продукт (КМП) «Наринэ», показатель ЛАИ возрастал, приближаясь к норме.

Больной Б., 20 лет. Дисбактериоз обусловлен приемом антибактериальных препаратов по поводу острого тонзиллита. При первичном исследовании ЛАИ отрицательный, что указывает на существование риска развития персистирующего воспаления. Состояние кишечной микрофлоры соответствовало II степени ДК и характеризовалось низкой численностью бифидобактерий (lg8), умеренно сниженным количеством лактобацилл (lg7), сниженным содержанием типичных эшерихий (lg6) при значительно высокой концентрации УПМ, среди которой присутствовали лактозонегативные энтеробактерии (lg6), золотистый стафилококк (lg4), грибы рода *Candida* (lg5). После трехмесячного приема КМП ЛАИ увеличился до 40,1. Состав микробиоценоза толстой кишки полностью восстановился: нормализовалась численность бифидобактерий, лактобацилл (lg9 и lg8 соответственно) и количество кишечной палочки (lg8), исчезли УПК.

Больная К., 55 лет. Дисбактериоз II степени обусловлен курсом лечебных доз облучения. При первичном обращении ЛАИ был равен 1,9. Состояние кишечной микрофлоры характеризовалось сниженным количеством бифидобактерий (lg8), избыточным содержанием типичных эшерихий (lg9), высокой численностью УПМ: грибов рода *Candida* (lg6), кластридий (lg6). После месячной коррекции дисбактериоза содержание типичных эшерихий осталось повышенным на фоне низкого количества бифидобактерий, исчезли грибы рода *Candida*, но численность кластридий сохранилась высокой. Показатель ЛАИ увеличился до 4,55, что не соответствовало норме и указывало на развитие воспалительного процесса.

Больной Б., 22 года. Дисбактериоз II степени обусловлен наличием инструментально подтвержденного диагноза ДЖВП по гиперкинетическому типу. При первичном исследовании ЛАИ имел нулевое значение — существовала угроза развития персистирующего воспаления. Состояние кишечного микробиоценоза характеризовалось сниженным содержанием бифидобактерий и лактобацилл (lg8 и lg6 соответственно), присутствием атипичных гемолитических эшерихий (lg7), высокой численностью УПМ (*Pseudomonas*, lg8) и грибов рода *Candida* (lg5). Спустя месяц после комплексного лечения ЛАИ увеличился до 14. В составе кишечной микрофлоры произошли значительные изменения: на порядок увеличилась численность бифидобактерий и лактобацилл (lg9 и lg7 соответственно). Исчезли гемолитические эшерихии и УПМ: грибы рода *Candida* и псевдомонады. Однако общее количество кишечной палочки уменьшилось до lg6, что соответствует I степени ДК.

Из выше перечисленного видно, что определение ЛАИ может способствовать не только получению объективной оценки местного антиоксидантного статуса у людей и возможного развития воспалительного процесса, но и характеристике, дифферен-

цирующей состояние кишечного микробиоценоза при использовании корректирующих дисбактериоз средств.

Известно, что изменение состава микробиоценозов открытых полостей организма человека наступают значительно раньше выраженного проявления того или иного патологического процесса и происходит на фоне иммунодефицитного состояния. Как показали проведенные исследования, определение ЛАИ супернатантов фекалий достаточно информативно для оценки местного антиоксидантного статуса, свидетельствующего о степени повреждения локальной неспецифической защиты организма при дисбиотических нарушениях. Таким образом, показатель локальной антиоксидантной защиты организма может быть использован в качестве скринингового теста, свидетельствующего о выраженности воспалительного процесса при дисбактериозе кишечника. Предлагаемый способ широко доступен для медицинской практики. Определение ЛАИ может способствовать не только получению объективной оценки степени повреждения кишечника условно патогенной микрофлорой, но и оценить клинический эффект пробиотической коррекции. Преимущество предлагаемого метода заключается в простоте забора материала, доступности химических реактивов, экономичности и информативности, позволяющей в короткие сроки (1 — 2 дня) получить сведения о состоянии локальной антиоксидантной защиты организма, отражающей изменения колонизационной резистентности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бондаренко В.М. Роль условно-патогенных бактерий при хронических воспалительных процессах различной локализации. Тверь, Триада, 2011.
2. Бондаренко В.М., Мацулевич Т.В. Дисбактериоз кишечника как клиничко-лабораторный синдром: современное состояние проблемы. М., ГЭОТАР-медиа, 2007.
3. Гапон М.Н., Терновская Л.Н. Показатели местной неспецифической резистентности при дисбактериозе толстой кишки. Журн. микробиол. 2010, 5: 53-57.
4. Журавлева Т.Д. и др. Возрастные особенности свободно-радикального окисления липидов и антиоксидантной защиты в эритроцитах здоровых людей. Клин. лаб. дагн. 2002, 8: 17.
5. Королюк М.А., Иванова Л.И. Метод определения активности каталазы. Лаб. дело. 1988, 1: 16-19.
6. Микробиологическая диагностика дисбактериоза кишечника. Методические рекомендации. М., 2007.
7. Отраслевой стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника». ОСТ 91500.11.0004-2003. Приказ МЗ РФ № 231 от 09.06.03.
8. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использования его для измерения активности супероксиддисмутазы. Вопр. мед. химии. 1999, 3: 14-15.
9. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. Современные методы в биохимии. М., Медицина, 1977.

Поступила 20.10.15

Контактная информация: Гапон Марина Николаевна, к.б.н.,
344000, Ростов-на-Дону, Газетный пер., 119, р.т. (863)234-91-83

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ УГЛЕВОД-СПЕЦИФИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО БАКТЕРИОФАГА ЭЛЬТОР

¹Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону; ²Ростовский-на-Дону противочумный институт

Цель. Изучение механизмов взаимодействия диагностического бактериофага эльтор с чувствительным к нему штаммом *Vibrio cholerae* El Tor 18507 с помощью прямого белкового профилирования, идентификация константных и переменных белков, участвующих во взаимодействии фага и клетки, а также углеводов-специфических рецепторов фага. *Материалы и методы.* Использовали коммерческий препарат холерного диагностического бактериофага эльтор, штамм *V.cholerae* El Tor 18507. Влияние углеводов на активность бактериофага определяли путем постановки пробы с фагом классическим и модифицированным нами методом. Белковые профили исследуемых объектов изучали с помощью метода MSP-анализа. *Результаты.* Показано, что сахароза ингибирует литическую активность бактериофага. Были изучены протеомные профили бактериофага эльтор и чувствительного индикаторного штамма, проведена идентификация константных и переменных белков исследуемых объектов посредством программы MSP Peak-List. *Заключение.* Анализ изменения профилей фага и микробной клетки при взаимодействии с сахарозой дал основание предположить, что сахароза в смеси культура — фаг вступает во взаимодействие именно с белковыми рецепторами фага, блокируя специфические к холерному вибриону рецепторы, что в дальнейшем проявляется в резком снижении активности фага по отношению к чувствительному штамму.

Журн. микробиол., 2016, № 2, С. 85—90

Ключевые слова: MALDI масс-спектрометрическое профилирование, протеомный профиль, Виотyper, MSP Peak-List, *Vibrio cholerae* El Tor, бактериофаг диагностический холерный эльтор

N.R.Telesmanich¹, E.V.Goncharenko², S.O.Chaika², I.A.Chaika², V.O.Telicheva²

POSSIBILITIES OF APPLICATION OF MALDI-TOF MASS-SPECTROMETRY FOR STUDY OF CARBOHYDRATE-SPECIFIC RECEPTORS FOR DIAGNOSTIC BACTERIOPHAGE EL TOR

¹Rostov State Medical University, Rostov-on-Don; ²Rostov-on-Don Institute for Plague Control, Russia

Aim. Study mechanisms of interaction of diagnostic bacteriophage El Tor with sensitive strain *Vibrio cholerae* El Tor 18507 using direct protein profiling, identification of constant and variable proteins, taking part in interaction of the phage and cell, as well as carbohydrate-specific phage receptors. *Materials and methods.* A commercial preparation of cholera diagnostic bacteriophage El Tor, strain *V.cholerae* El Tor 18507 were used. Effect of carbohydrates on bacteriophage activity was determined in experiments with phage by a classic and modified by us method. Protein profiles of the studied objects were studied using MSP-analysis method. *Results.* Sucrose was shown to inhibit lytic activity of bacteriophage. Proteome profiles of El Tor bacteriophage and sensitive indicator strains were studied, identification of constant and variable proteins of the studied objects by MSP Peak-list program was carried out. *Conclusion.* Analysis of changes of profiles of phage and microbial cell during interaction with sucrose gave a basis for assuming, that sucrose in the mixture of culture-phage enters interaction namely with phage protein receptors, blocking receptors specific for cholera vibrio, that subsequently manifests in a sharp decrease of phage activity against the sensitive strain.

Key words: MALDI mass-spectrometric profiling, proteomic profile, Biotyper, MSP Peak-List, *Vibrio cholerae* El Tor, diagnostic cholera bacteriophage El Tor

Немаловажную роль в изменчивости и выживаемости холерных вибрионов в водоемах играют фаги [2]. Бактериофаги являются постоянным спутником патогенных вибрионов, а их присутствие в клетках бактерий приводит к появлению новых свойств и обеспечивает эволюционную приспособляемость микроорганизмов к меняющимся условиям окружающей среды за счет переноса генетического материала [4]. Обнаружение холерных бактериофагов является мерой дополнительного контроля природной среды. Трудности широкого применения бактериофагов, в основном, связаны с проблемой формирования фагорезистентности микроорганизмов, что отрицательно сказывается на диагностической ценности фаговых препаратов. С научной точки зрения проблема расшифровки механизмов фагорезистентности, с которой сталкиваются исследователи в последние двадцать лет, при оценке эпидемической значимости не утратила своей актуальности [6]. Фагоустойчивость бактерий связывают с классической лизогенией, нарушением проникновения нуклеиновой кислоты фага в бактерию, наличием у бактерий системы рестрикции-модификации, приобретением R-плазмид и др. [1]. Возможным подходом к изучению формирования фагорезистентности является изучение поверхностных структур, таких как углевод-специфические рецепторы фагов, участвующих во взаимодействии с поверхностными структурами клеток-мишеней холерного вибриона, методом масс-спектрометрии [5, 8]. Возможности прямого белкового профилирования могут распространяться значительно шире, чем идентификация микроорганизмов бактериального и грибкового происхождения. Измерение стабильного спектра белкового объекта и его деградация может способствовать изучению бактерий (фагов) и их взаимоотношений с бактериальной клеткой.

Детальное изучение молекулярных основ механизмов взаимоотношения бактериофага с клеткой хозяина имеет не только теоретическое, но и практическое значение. Важным аспектом является знание поверхностных компонентов изучаемых объектов, ответственных за этот процесс [7]. Особую роль в межклеточных взаимодействиях играют лектиновые рецепторы, поэтому изучение углеводной специфичности рецепторов фагов является важным для познания механизмов формирования фагорезистентности.

Целью данной работы явилось изучение механизмов взаимодействия диагностического бактериофага эльтор с чувствительным к нему штаммом *Vibrio cholerae* El Tor 18507 с помощью прямого белкового масс-спектрометрического профилирования, идентификация константных и переменных белков, участвующих во взаимодействии фага и клетки, а также углевод-специфических рецепторов фага.

В работе использовали коммерческий препарат холерного диагностического бактериофага эльтор и чувствительный к нему паспортизированный музейный штамм *V.cholerae* El Tor 18507. Препарат фага эльтор представляет собой стерильные фильтраты фаголизатов бульонных культур холерных вибрионов, содержащих взвесь частиц фага эльтор.

Для изучения роли углевод-специфических рецепторов, участвующих во взаимодействии микробных клеток холерного вибриона с исследуемым фагом, в работу был взят углевод — сахароза фирмы «Serva» в конечной концентрации 1%.

Питательные среды для экспериментов включали бульон и агар Мартена (0,7 и 1,5%) рН=7,6 — 7,8.

В работе применяли следующие методики. Постановку пробы с фагом двухслойным методом по Грациа проводили в соответствии с инструкцией по применению диагностического бактериофага эльтор. Модифицированная постановка пробы с фагом двухслойным методом. Постановка пробы проводится аналогично методу Грациа,

за исключением того, что каждое рабочее разведение фага предварительно инкубировали с углеводом в конечной концентрации 1% в течение 1 часа. Классический метод использовали в качестве контроля активности фага, а модифицированный — для изучения влияния углевода на активность бактериофага эльтор.

Изучение белковых профилей исследуемых объектов проводили с помощью метода MSP-анализа. Методом прямого MALDI масс-спектрометрического профилирования были исследованы бактериофаг эльтор, чувствительная к нему культура холерного вибриона, смесь фага с культурой холерного вибриона. Также было исследовано изменение белкового профиля фага при инкубации с сахарозой для выявления белков, участвующих в гликозилировании лектиновых рецепторов, а также изменения этих белков в результате взаимодействия с углеводом.

Все образцы проводили через процедуру экстракции трифторуксусной кислотой (80% TFA) для создания репрезентативных спектров, а также для культур холерных вибрионов — с целью обеззараживания. Каждый образец оставляли на 30 мин. при комнатной температуре, добавляли 150 мкл бидистиллированной воды и 20 мкл ацетонитрила. Смесь встряхивали на вортексе, центрифугировали (12 000 — 13 000 об/мин) — 2 минуты. Супернатант в количестве 0,5 мкл размещали на ячейке MSP-чипа, и после полного высыхания наслаивали 0,5 мкл раствора матрицы (α -циано-4-гидроксикоричная кислота в 50% ацетонитрила и 2,5% трифторуксусной кислоты). В программе Flex Control проводили обстрел в ручном режиме, снимали спектры и проводили их анализ. По шкале абсцисс были отложены значения m/z (молекулярная масса), по шкале ординат — интенсивность пиков, регистрируемая при масс-спектрометрическом анализе (количество белков с конкретной молекулярной массой). Изменения основных спектров фага эльтор и микробной клетки холерного вибриона при их взаимодействии и под влиянием углевода (сахарозы) оценивали по степени достоверных совпадений в виде показателя score, который отражает степень схожести профиля изучаемого объекта с белковым профилем объекта, внесенного в базу данных, измеряется в диапазоне от 0 до 3. Значения 2,00 — 3,00 указывают на высокое совпадение изучаемого объекта с объектом базы данных, значения 1,700 — 1,999 — низкая схожесть с объектом из базы данных, менее 1,700 — отсутствие совпадений. Используя программу MSP Peak-List проводили табличную оценку основных спектров изучаемых объектов.

Изначально мы изучили основные спектры исследуемых объектов, которые оценивались по таким параметрам, как положение пиков (молекулярная масса), их частота, интенсивность (количество белков с конкретной молекулярной массой) [3, 5, 8]. Было выяснено, что масс-спектры фага El Tor содержали 70 пиков, культуре *V.cholerae* 18507 был присвоен 61 пик. У проинкубированной смеси фага с холерным вибрионом сохранялось 70 пиков. MALDI масс-спектрометрическое профилирование бактериофага эльтор показало, что у данного фага можно выделить из всех 70 пиков один доминантный с молекулярной массой 4373 Да, характеризующийся 100% интенсивностью и свидетельствующий о максимальном количестве белков с данной молекулярной массой, в то время, как интенсивность остальных пиков фага составила 1 — 20%. Это свидетельствует о том, что комплекс белков с молекулярной массой 4373 Да является основным для фага. При сравнительном анализе протеомных профилей исследуемых образцов было выяснено, что основной спектр холерного вибриона при инкубации с фагом имел практически аналогичную картину с исходным образцом *V.cholerae*. Молекулярная масса доминантного пика белкового спектра смеси составила 4367,2 Да (100% интенсивность). Все основные пики спектра *V.cholerae* сохранились, но при взаимодействии с фагом снизилась их интенсивность, и появились новые пики с невысокой интенсивностью.

Также нами была изучена роль лектиновых рецепторов бактериофага в его взаимодействии с микробной клеткой. Для этого применяли метод конкурентного ингибирования путем введения в систему фаг — клетка свободного углевода (сахарозы). Бактериологическими методами было показано, что сахароза ингибирует литическую

активность бактериофага. При постановке пробы с фагом двухслойным методом на чашках фаг, проинкубированный с сахарозой, не давал сплошной зоны лизиса в месте нанесения по сравнению с контролем, что свидетельствовало об активности рецепторов фага, специфичных сахарозе во взаимоотношении фаг — микробная клетка.

При проведении сравнительного анализа белкового спектра нативного фага эльтор и образца, проинкубированного с сахарозой, было выяснено, что при взаимодействии с сахарозой происходит ингибирование доминантных белков фага с массой 4373 Да. В процессе каскада реакций образуется большое количество новых белков с низкой интенсивностью в диапазоне 7000 — 14 500 Да, и возрастает интенсивность уже имеющихся белков в диапазоне от 3 до 4,5 тысяч Да.

При инкубации исследуемого штамма *V.cholerae* 18507 с 1% сахарозой (1 час) не наблюдалось значимого изменения картины основного спектра. Таким образом, можно предположить, что сахароза в смеси культура — фаг вступает во взаимодействие именно с белковыми рецепторами фага, блокируя специфичные к холерному вибриону углевод-специфичные рецепторы с молекулярной массой 4373, что в дальнейшем проявляется в резком снижении активности фага по отношению к чувствительному штамму. Это было показано нами ранее в микробиологических опытах.

Основным преимуществом программы MALDI Biotyper («Bruker Daltonics») является возможность пополнения персональной базы новыми спектрами и подключение к MALDI Biotyper-программе для обработки и анализа масс-спектров для последующей идентификации, которая в дальнейшем будет основана на сравнении полученных спектров с персональной библиотекой референтных спектров. Фаг эльтор был нами внесен в базу данных, в дальнейшем при профилировании фаг идентифицировался программой Biotyper с высоким показателем score 2,845, что свидетельствовало о степени «узнавания» самого себя в базе данных. При сравнении спектра холерного вибриона с внесенным в базу данных спектром фага показатель score равнялся нулю, что явилось отрицательным контролем в корректности «узнавания» фагом самого себя. При сравнении спектров смеси (фаг + холерный вибрион) со спектром фага из базы данных значение score соответствовало 0,324, что свидетельствовало об изменении спектра фага. Но когда в знаменателе был спектр не фага, а холерного вибриона, внесенного в базу данных, показатель score смеси фага с холерным вибрионом резко повышался и равнялся 2,449, что свидетельствовало об отсутствии изменений со стороны культуры в смеси фаг — клетка. Профили фага эльтор и культуры холерного вибриона, проинкубированные с сахарозой, также были изучены в сравнении с профилем фага, внесенного в базу данных. При инкубации с сахарозой, фаг не «узнавал» себя в базе данных (score 0,973), в отличие от холерного вибриона, который при взаимодействии с сахарозой продолжал «узнавать» себя с высоким показателем score, равным 2,380. При сравнительном изучении показателей score видно, что при инкубации с сахарозой изменения происходят именно у фага, а не у холерного вибриона.

При применении программы Biotyper возможна табличная оценка молекулярных масс (MSP Peak-List). Основные спектры каждого изучаемого объекта посредством данной программы преобразовывались в таблицы MSP Peak-List. В дальнейшем нами были проанализированы данные MSP Peak-List бактериофага, холерного вибриона и проинкубированной смеси. И в MSP Peak-List мы выявили аналитическим путем принадлежность каждого пика либо спектру культуры, либо спектру фага, а также новые спектры, возникающие при взаимодействии фага с культурой и при добавлении сахарозы.

Анализируя пики при помощи MSP Peak-List было выяснено, что у фага эльтор 6 пиков, которые при инкубировании с культурой холерного вибриона не исчезают (3116,6; 3213,5; 33316; 3834,9; 3983,2 и 6194,8±1,5). Однако при добавлении сахарозы последний пик белкового спектра исчезает. Таким образом, у фага эльтор выявлено 5 константных белков и один переменный.

Аналогичным образом мы сравнили протеомный профиль *V.cholerae* 18507 до и

после инкубирования с фагом. Нами выявлено, что после инкубации сохраняется 33 пика из 61, которые при добавлении сахарозы также остаются константными, помимо одного переменного.

Помимо константных и переменных белков, были выявлены пики, появляющиеся при совместном инкубировании фага с микроорганизмом, которых не было ни у фага, ни у культуры до инкубирования. Таковых оказалось 31 пик. Однако в присутствии сахарозы эти пики (белки) вели себя по-разному: 8 пиков исчезает из таблицы, однако 23 пика остаются неизменными, и при этом появляется 10 комплексов белков с совершенно новыми значениями масс.

Изучение механизмов фагорезистентности имеет важное научно-прикладное значение. Вместе с тем, продолжает оставаться актуальным изучение взаимоотношений фага и микробной клетки с помощью новейших методов исследования, результаты которых затем могут быть использованы в выяснении формирования фагорезистентности, где важная роль принадлежит изменению поверхностных структур фаговой корпускулы и клетки микроорганизма. Бактериофаги имеют на своей поверхности целый спектр рецепторов, узнающих углеводы и определяющих специфичность межклеточных взаимодействий. Спектр этих рецепторов различается у разных видов бактерий и фагов и является определяющим в рецептор-акцепторных взаимодействиях в системе фаг — бактерия. В свою очередь, на поверхности бактериальных клеток в качестве лигандов рецепторов выступают углеводы, являющиеся своеобразными антеннами, передающими сигнал внутрь клетки после взаимодействия с рецептором. Такие взаимодействия являются ключевыми для бактериальной клетки и стимулируют каскад биологических реакций. Подобная система может действовать на модели фаг — клетка при изучении углеводной специфичности рецепторов фага. В литературе имеется очень мало информации об изучении углевод-специфических рецепторов фагов. Одним из новых методов, используемых для изучения механизмов фагорезистентности, является MALDI-TOF масс-спектрометрия. MALDI масс-спектрометрия — методический подход, использующий протеомный анализ в изучении биологических объектов, в основном, используется для идентификации микроорганизмов, однако изучение его возможностей для применения в научных исследованиях является основной задачей, которая будет способствовать развитию приоритетных направлений протеомного анализа. Наши исследования посвящены изучению фагов с помощью данного метода. В литературе не было найдено аналогичных работ по изучению бактериофагов посредством MALDI-TOF масс-спектрометрии. В результате проведенных исследований впервые были изучены протеомные профили бактериофага и чувствительной к нему культуры холерного вибриона. Проведен протеомный анализ изменения профиля фага при взаимодействии с углеводами на поверхности микробной клетки с применением метода конкурентного ингибирования при использовании свободного углевода. Была проведена сравнительная характеристика изменения белковых профилей при взаимодействии фаг — клетка. Установлено, что комплекс доминантных белков, соответствующих молекулярной массе 4373 Да, является рецепторами фага, участвующими во взаимодействии с микробной клеткой холерного вибриона. Показано, что сахароза в смеси холерный вибрион — фаг вступает во взаимодействие именно с белковыми рецепторами фага (комплекс белков с массой 4373 Да), блокируя этим лектиновые рецепторы фага, специфичные поверхностным структурам холерного вибриона. Это проявляется в резком снижении активности фага по отношению к чувствительному штамму. Эти исследования были подтверждены нами при изучении показателей score данных объектов. Протеомный профиль бактериофага эльтор был внесен нами в базу данных, и проведен сравнительный анализ спектров исследуемых образцов со спектром фага из базы данных с использованием показателя score. Сравнительный анализ показателей score изменения белковых профилей фага при инкубации с сахарозой и штамма холерного вибриона при инкубации с этим углеводом продемонстрировал существенные изменения протеома именно со стороны фага (score 0,973). Протеомный профиль

холерного вибриона оставался практически неизменным, и культура идентифицировалась базой данных с достаточно высоким показателем score, равным 2,380. Следовательно, именно бактериофаг претерпевает основные изменения протеомного профиля в процессе взаимодействия. И именно его лектиновые рецепторы, специфичные сахарозе, играют ключевую роль в ослаблении литической активности по отношению к чувствительной культуре. При сравнении спектров смеси фаг + холерный вибрион со спектром фага из базы данных значение score соответствовало 0,324, что свидетельствовало об изменении спектра фага. Но когда в знаменателе был спектр не фага, а холерного вибриона, внесенного в базу данных, показатель score смеси фага с холерным вибрионом резко повышался и равнялся 2,449. Что свидетельствовало об отсутствии изменений со стороны культуры в смеси фаг-клетка.

Используя табличную оценку молекулярных масс удалось проанализировать данные MSP Peak-List бактериофага, холерного вибриона и проинкубированной смеси. И в MSP Peak-List мы выявили аналитическим путем константные и переменные белки, возникающие после совместного инкубирования, участвующие в рецепторных взаимодействиях фага с холерным вибрионом. Так, было выяснено, что у фага эльтор 5 константных белков и один переменный.

Аналогичным образом мы сравнили протеомный профиль *V.cholerae* 18507 до и после инкубирования с фагом. Нами выявлено, что у холерного вибриона 32 константных белка и один переменный.

Помимо константных и переменных белков, были выявлены пики, появляющиеся при совместном инкубировании фага с микроорганизмом, которых не было ни у фага, ни у культуры до инкубирования (31 пик). Однако в присутствии сахарозы эти пики (белки) вели себя по-разному: 8 пиков исчезает из таблицы, однако 23 пика остаются неизменными, и при этом появляется 10 комплексов белков с совершенно новыми значениями масс.

Таким образом, применение метода MALDI-TOF масс-спектрометрии является эффективным инструментом не только для идентификации микроорганизмов, но и для изучения фагов и механизмов их взаимодействия с бактериальной клеткой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дерябин Д.Г. Антилизозимная активность бактерий как фактор их фагорезистентности. Автореф. дисс. канд. мед. наук. Челябинск, 1989.
2. Кудрякова Т.А., Гаевская Н.Е., Качкина Г.В. Биологические свойства фагов патогенных вибрионов, выделенных из внешней среды. *Здравоохранение РФ*. 2011, 5: 41.
3. Лебедева А.Т., Артеменко К.А., Самгина Т.Ю. Основы масс-спектрометрии белков и пептидов. М., Техносфера, 2012.
4. Остроумова Н.М., Мельникова А.Ф., Царева С.П. Проблемы ООИ. 1971, 6: 4-10.
5. Телесманич Н.Р., Агафонова В.В., Чайка И.А., Сеина С.О., Чемисова О.С., Гончаренко Е.В. MALDI масс-спектрометрический анализ в типировании и внутривидовой дифференциации холерных вибрионов на основе создания референс-библиотеки протеомных профилей. *Медицинский вестник Юга России*. 2014, 2: 88-91.
6. Телесманич Н.Р., Ломов Ю.М. Лабораторная диагностика холеры (анализ и перспективы совершенствования). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2009, 11: 51-55.
7. Телесманич Н.Р., Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М., Гончаренко Е.В. Роль галактозо-специфического рецептора — лектина в бактерицидной активности гемолизина *Vibrio cholerae* не O1/O139. *Журн. микробиол.* 2010, 1: 10-14.
8. Телесманич Н.Р., Чайка С.О., Водяницкая С.Ю., Чемисова О.С., Чайка И.А. Применение масс-спектрометрического метода MALDI-TOF для межвидовой дифференциации близкородственных видов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014, 8 (59): 27-28.

Поступила 10.06.15

Контактная информация: Чайка Софья Олеговна,
344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40

ОБЗОРЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

С.Н.Гаврилов, Т.С.Скачкова, О.Ю.Шипулина, Ю.А.Савочкина, Г.А.Шипулин, В.В.Малеев

СОВРЕМЕННЫЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ СЕПСИСА

Центральный НИИ эпидемиологии, Москва

Этиологическая диагностика сепсиса представляет собой одну из наиболее сложных проблем современной медицины в связи с широким разнообразием возбудителей сепсиса, многие из которых являются компонентами нормальной микрофлоры человека. Недостатками современного «золотого стандарта» микробиологической диагностики этиологии сепсиса методом посева крови на стерильность являются длительность культивирования, ограничение в выявлении некультивируемых форм микроорганизмов, значительное влияние предварительной эмпирической антибиотикотерапии на результат анализа. Этим недостаткам лишены методы молекулярной диагностики, активно разрабатываемые и внедряемые в последнее десятилетие. В обзоре рассмотрены основные современные методы молекулярно-биологической диагностики, приведены актуальные данные по их диагностической характеристике. Особое внимание уделено методам ПЦР-диагностики, включая новые российские разработки. В сравнительном аспекте рассмотрены методы гибридизации нуклеиновых кислот и протеомного анализа. Дана оценка применения и перспектив развития методов молекулярной диагностики сепсиса.

Журн. микробиол., 2016, № 2, С. 91—99

Ключевые слова: сепсис, молекулярные методы, этиология сепсиса, методы молекулярной диагностики, ПЦР, ПЦР в реальном времени

S.N.Gavrilov, T.S.Skachkova, O.Yu.Shipulina, Yu.A.Savochkina, G.A.Shipulin, V.V.Maleev

CONTEMPORARY MOLECULAR-GENETIC METHODS USED FOR ETIOLOGIC DIAGNOSTICS OF SEPSIS

Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Etiologic diagnostics of sepsis is one of the most difficult problems of contemporary medicine due to a wide variety of sepsis causative agents, many of which are components of normal human microflora. Disadvantages of contemporary «golden standard» of microbiologic diagnostics of sepsis etiology by seeding of blood for sterility are duration of cultivation, limitation in detection of non-cultivable forms of microorganisms, significant effect of preliminary empiric antibiotics therapy on results of the analysis. Methods of molecular diagnostics that are being actively developed and integrated during the last decade are deprived of these disadvantages. Main contemporary methods of molecular-biological diagnostics are examined in the review, actual data on their diagnostic characteristic are provided. Special attention is given to methods of PCR-diagnostics, including novel Russian developments. Methods of nucleic acid hybridization and proteomic analysis are examined in comparative aspect. Evaluation of application and perspectives of development of methods of molecular diagnostics of sepsis is given.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 2, P. 91—99

Key words: sepsis, molecular methods, sepsis etiology, molecular diagnostics methods, PCR, real time PCR

Сепсис является актуальной проблемой современной медицины, важность которой определяется ростом количества больных, высокой летальностью и большими экономическими затратами на лечение. В среднем, летальность при сепсисе оценивается в 20 — 40%, а в случае развития инфекционно-токсического шока — в 80% [1]. В настоящее время сепсис определяется как патологический процесс, в основе которого лежит реакция организма в виде генерализованного (системного) воспаления на инфекцию различной природы (бактериальную, вирусную, грибковую) [3]. Обнаружение микроорганизмов в кровотоке у больных без клинико-лабораторных подтверждений синдрома системного воспаления может расцениваться как транзиторная бактериемия, которая может не быть обусловлена септическим процессом. А отсутствие бактериемии не должно исключить возможности диагноза «сепсис» при наличии существующих критериев сепсиса [3]. Тем не менее, выделение микроорганизма из крови (в норме стерильной жидкости) и его идентификация важны, так как этиологическая диагностика сепсиса является определяющей в выборе адекватных режимов антибактериальной терапии. «Золотым стандартом» расшифровки этиологии сепсиса остается бактериологический посев. Посев образца крови пациента позволяет выявить жизнеспособные формы микроорганизмов, которые находятся в активной стадии роста и являются наиболее вероятными возбудителями заболевания. Теоретическим пределом чувствительности метода считается 1 КОЕ бактерий или грибов на 10 мл образца крови [30]. В настоящее время доступно несколько полностью автоматизированных платформ для гемокультивирования, однако метод имеет существенные недостатки: не позволяет выявить некультивируемые микроорганизмы, для которых еще не разработаны методы лабораторного культивирования, а также вирусы; прием анти-микробных препаратов пациентом перед микробиологическим исследованием значительно снижает эффективность выявления микроорганизма из-за снижения количества жизнеспособных микробных клеток; время до получения результатов культивирования составляет, в среднем, 48 — 72 часа [25, 38]. Кроме того, для гемокультивирования требуется большой объем образца крови (до 20 — 30 мл) [24]. Получение такого количества клинического материала невозможно, например, для новорожденных, а использование меньших объемов образца значительно снижает аналитическую чувствительность микробиологической диагностики для данной группы пациентов.

Вышеуказанных недостатков лишены методы молекулярной диагностики, основанные на анализе белков или нуклеиновых кислот микроорганизмов. Ключевым преимуществом этих методов является возможность выявления некультивируемых форм возбудителей и одновременное выявление нескольких разных мишеней (как филогенетических маркеров патогенов, так и маркеров их антибиотикорезистентности) в одном клиническом образце, а также сокращение длительности анализа.

Разнообразие методов молекулярной диагностики. В настоящее время для клинического применения доступны тест-системы на основе трех различных методов молекулярно-биологического анализа: гибридизации нуклеиновых кислот, протеомного анализа с использованием масс-спектрометрии и ПЦР-амплификации фрагментов ДНК. Большинство ПЦР тест-систем реализовано в формате флуоресцентной детекции результата в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Различают мультиплексные тесты ПЦР-РВ, в которых идентификация происходит в процессе амплификации благодаря использованию нескольких систем праймеров и зондов, узкоспецифичных к различным мишеням, и тесты, в которых сначала проводится амплификация с широкоспецифичными праймерами, а затем полученные ПЦР-продукты идентифицируют путем гибридизации, масс-спектрометрического анализа или секвенирования и анализа полученных последовательностей ДНК.

Существуют две стратегии применения молекулярных методов в диагностике этиологии сепсиса — с предварительным гемокультивированием или напрямую, при непосредственном анализе образцов цельной крови. Гибридизационные и масс-спектрометрические тесты на сегодняшний день валидированы только для анализа гемокультур, а ПЦР-тесты реализованы как в формате анализа гемокультур, так и в формате прямого анализа клинических образцов.

Гибридизационные методы. Методы, основанные на *in situ* гибридизации генов филогенетических маркеров (или непосредственно рибосомальной РНК) возбудителей сепсиса с флуоресцентно меченными зондами (FISH), в настоящее время реализованы в тест-системах американских компаний AdvanDX (PNA FISH™ и QuickFISH™) и Gen-Probe

Inc. (AccuProbe, Bact). Эти методы показали высокую диагностическую чувствительность и специфичность (табл. 1). В нескольких работах были показаны оптимизация антибиотикотерапии и сокращение курса лечения по результатам применения теста PNA FISH™ [17].

Альтернативой *in situ* гибридизации является метод ДНК-ДНК гибридизации, реализованный в тест-системах серии Verigene компании Nanosphere, США. Эти полностью автоматизированные тест-системы подразумевают стадию выделения микробной ДНК из гемокультуры и двухступенчатую гибридизацию целевых фрагментов ДНК с зондами, иммобилизованными на микроматрице и наночастицах золота. Результат гибридизации детектируют физико-химическими методами [39]. В настоящее время в США и ЕС коммерчески доступны тест-системы для выявления грамположительных (BC-GP) и грамотрицательных (BC-GN) бактерий, а также нескольких генов их антибиотикорезистентности (табл. 1).

В целом, гибридизационные тесты позволяют существенно ускорить процесс идентификации возбудителей сепсиса в гемокультурах и одновременно выявить маркеры антибиотикорезистентности. Однако результаты такого анализа зависят от стадии культивирования, так как низкая эффективность гибридизации нуклеиновых кислот не позволяет достичь достаточной чувствительности метода для прямого анализа клинических образцов. Кроме того, на результат FISH-анализа влияет проницаемость клеточной стенки микроорганизмов для флуоресцентных зондов [18, 29].

Методы протеомного анализа. Протеомный анализ в настоящее время успешно применяется для идентификации микроорганизмов в жидких гемокультурах или колониях, полученных на твердых средах. Анализ выполняется методом масс-спектрометрии (MALDI-TOF) и позволяет детектировать белки, специфичные для тех или иных микроорганизмов (в том числе, маркеры антибиотикорезистентности), и идентифицировать их по соответствующим базам данных. Опыт применения тест-систем BioType™ компании BrukerDaltonics (Германия), Vitek MS IVD (BioMerieux, Франция), Axima@SARAMIS™ (Shimadzu), MALDI micro MX™ (Waters Corporation) для идентификации возбудителей сепсиса в гемокультурах бактерий и грибов показывает, что диагностическая чувствительность метода находится в диапазоне 76 — 98%, а специфичность превышает 96% [28]. В клинических исследованиях было показано сокращение времени пребывания в стационаре за счет оптимизации антибиотикотерапии у 11,3 — 13,4% взрослых пациентов и 2,5% детей с сепсисом по результатам MALDI-TOF диагностики [13, 42]. Преимуществами масс-спектрометрической диагностики является сокращение времени анализа, мини-

Т а б л и ц а 1. Гибридизационные тест-системы

| Название теста | Принцип анализа | Число выявляемых мишеней | Диагностическая чувствительность ¹ | Диагностическая специфичность ¹ |
|------------------|--|---|---|--|
| PNA FISH | FISH с пептидно-нуклеиновыми (ПНК) зондами | 10 видов | 94—99 | 99—100 |
| QuickFISH | FISH рПНК с ПНК-зондами | 7 видов бактерий в 3 тестах | 98,8—99,5 | 89,5 |
| AccuProbe (Bact) | FISH в модификации (технология НРА) | Отдельные тесты: стрептококки группы В, <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 80,8—100 | 98,7—100 |
| Verigene BC-GP | ДНК-ДНК гибридизация с иммобилизованными зондами | 9 видо- и 4 родоспецифичных мишени, гены антибиотикорезистентности <i>mecA</i> , <i>vanA</i> , <i>vanB</i> | 80—100 | 99,5—100 |
| Verigene BC-GN | | 4 видо- и 4 родоспецифичных мишени, 6 генов бета-лактамаз | 86—100 ² | 100 ² |

П р и м е ч а н и е. ¹По сводным данным обзора Liesenfeld O. et al. [28]; ²по данным производителя для FDA (управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов).

мальные трудозатраты на один анализ и возможность выявления широкого спектра микроорганизмов [28]. Существенными недостатками метода являются высокая стоимость оборудования, зависимость от стадии культивирования (невозможность работы непосредственно с клиническими образцами) и невозможность выявления нескольких возбудителей в одном образце вследствие ограниченной чувствительности (величины динамического диапазона) масс-спектрометров [14].

Методы ПЦР-анализа. В настоящее время амплификация ДНК с помощью ПЦР является единственным вариантом анализа, адаптированным для прямого анализа образцов крови. Наравне с методами прямой ПЦР-диагностики продолжают развиваться и активно использоваться методы ПЦР-анализа первичных гемокультур, инкубируемых менее 24 часов. В связи с широким распространением антибиотикорезистентных штаммов возбудителей большое значение приобретают своевременное выявление таких микроорганизмов, а значит, и наборы, позволяющие выявлять маркеры антибиотикорезистентности. Ниже подробно рассмотрены ПЦР-тесты, валидированные для клинического применения. Большинство из них коммерчески доступны и разрешены для клинического применения только в странах ЕС.

Тест-системы Prove-it sepsis (Mobidiag, Финляндия) и FilmArray (BioFire Diagnostics, США) полностью автоматизированы, начиная со стадии экстракции ДНК. Тест-система Prove-it основана на амплификации участков генов бактериальных топоизомераз *gyrB* и *parE* [20]. Текущая версия тест-системы позволяет детектировать 60 фило типов бактерий и 7 видов грибов рода *Candida*, а также гены резистентности бактерий к ванкомицину (*vanA/B*) и метициллину (*mecA*). Диагностическая чувствительность и специфичность тест-системы Prove-it, определенные по результатам анализа гемокультур, полученных от 2107 пациентов, в двухцентровом исследовании составили 95 и 99% соответственно. Причем, точность детекции метициллин-резистентных стафилококков оказалась близкой к 100% [7, 40]. Тест-система FilmArray позволяет детектировать порядка 25 таксономических групп патогенов (включая несколько видов грибов рода *Candida*) и 4 гена резистентности (к метициллину, ванкомицину и карбапенемам), панель может быть расширена для одновременной детекции порядка 100 мишеней [34]. Валидация тест-системы была проведена в ретроспективном и проспективном исследованиях с использованием около 200 гемокультур, полученных от взрослых и детей с бактериемией. Чувствительность и специфичность метода для различных бактериальных патогенов варьировали в диапазоне 83 — 100%. Важным недостатком тест-системы, как и в случае Prove-it, оказалась невозможность выявления возбудителей сепсиса в смешанных культурах [8].

ПЦР-анализ гемокультур в формате мультиплексных тестов реализован в панели тест-систем Huplex (Amplex Diagnostics, Германия), а также в тестах Xpert MRSA/SA BC (Cepheid, США), StaphPlex (Qiagen, США) и StaphSR assay (BD GeneOhm, США). Тест-системы Huplex основаны на использовании праймеров, выявляющих основные маркеры антибиотикорезистентности и гены токсинов бактерий, являющихся возбудителями нозокомиальных инфекций. Идентификация ПЦР-продуктов происходит путем их гибридизации с высокоспецифичными зондами и последующей иммуноферментной детекции гибридной ДНК. Время анализа гемокультур по схеме Huplex составляет 3 — 4 часа. В настоящее время коммерчески доступны 8 тестов Huplex для этиологической диагностики нозокомиальных инфекций, включая инфекции, вызываемые полирезистентными штаммами возбудителей. Чувствительность и специфичность метода существенно варьируют в различных тестах от 92,5 до 100% [43]. Одно из последних клинических исследований тест-системы Huplex MRSA plus для идентификации метициллин-резистентных *Staphylococcus aureus* (MRSA) выявило 100% чувствительность и специфичность при нормировании на результаты микробиологической диагностики [7].

Тест-система Xpert MRSA/SA BC представляет собой полностью автоматизированное закрытое решение на аппаратной базе GeneXpert, предназначенное для дифференцированной диагностики MRSA и метициллин-чувствительного *Staphylococcus aureus* (MSSA) в гемокультурах. Время анализа составляет не более 1 часа, включая стадию автоматизированной экстракции ДНК. Чувствительность и специфичность теста составляют соответственно 100 и 98,6% для MSSA и 98,3 и 99,4% для MRSA [28]. В недавнем исследовании показано снижение стоимости антибиотикотерапии септических пациентов при ее оптимизации по результатам тестов Xpert MRSA/SA [6].

Тест-система StaphPlex позволяет амплифицировать и детектировать 18 различных

Таблица 2. Тест-системы прямой ПЦР-диагностики этиологии сепсиса в клинических образцах, коммерчески доступные в ЕС

| Тест (производитель) | Патогены (заявленные) | Идентификация результатов | Выборка | Диагностическая чувствительность/ специфичность (референс) |
|--|---|---|--|--|
| SepsiTest (Molzym) | Более 450 видов бактерий и 24 вида грибов | Секвенирование ампликонов и анализ последовательностей алгоритмами NCBI BLAST, SepsiTest BLAST (Molzym) или RipSeq (Isentio) | Около 600 пациентов с подозрением на сепсис (по 3 исследованиям) [19, 23, 29, 31, 37, 38] | 87/86 (для гемокультур) |
| VYOO (Analytik Jena) | 34 вида бактерий, 7 видов грибов | Микроматричный анализ смеси ампликонов (microarray) | 245 пациентов с подозрением на сепсис (по 1 исследованию) [9] | 60/75 (для гемокультур) |
| LightCycler SeptiFast (Roche) | 14 групп патогенных бактерий и 6 видов грибов родов <i>Aspergillus</i> и <i>Candida</i> [26] | Анализ кривых плавления ампликонов, идентификация по базе данных точек плавления с помощью ПО SeptiFast Identification Software | Около 7500 пациентов с сепсисом различной этиологии и сопутствующими инфекциями (по 41 исследованию) [5, 10, 12, 21, 23, 26, 27, 28, 32, 41] | Среднее по 34 исследованиям: 80/95 для бактериемии, 61/99 для фунгемии (клинически подтвержденный диагноз) |
| MagicPlex Sepsis Test (Seegene) | Детекция: 73 вида грам-, 16 видов грам+ бактерий и 6 видов грибов. Идентификация: 12 видов грам-, 9 видов грам+ бактерий, 6 видов грибов | Гибридизация ампликонов с высоко-специфичными зондами | 267 взрослых пациентов с сепсисом различной этиологии (по 1 исследованию) [11] | 65/92 (клинически подтвержденный диагноз) |
| FTD Neonatal sepsis (Fast-track diagnostics) | 3 реакционных смеси: 1. стрептококки группы В и <i>Listeria monocytogenes</i> ; 2. <i>Escherichia coli</i> ; 3. цитомегаловирус, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> / <i>U. parvum</i> | Анализ сигналов ПЦР-РВ, полученных с различными праймерами | Результаты клинических исследований в настоящее время недоступны | Результаты клинических исследований в настоящее время недоступны, но тест валидирован для использования в клинической диагностике [16] |

генетических маркеров стафилококков, включая гены антибиотикорезистентности и видовые маркеры *S. aureus*, в рамках одной реакционной смеси — в формате так называемого «супер-мультиплекса». Система валидирована для анализа гемокультур. Время анализа гемокультуры до получения результата составляет 5 часов, для данного теста отмечена 100% чувствительность и специфичность в диапазоне 95,5 — 100% [28].

Тест-система StaphSR assay предназначена для дифференцированной детекции MRSA/MSSA с помощью ПЦР-РВ на базе амплификатора SmartCycler (Cepheid), время анализа составляет 2,5 часа. В первом клиническом исследовании были показаны высокие диагностические характеристики метода (чувствительность 98,9% и специфичность 100%), однако расширение выборки образцов выявило ограничения области применения данной тест-системы [28].

Методы прямого выявления возбудителей в клинических образцах развиваются наиболее интенсивно, что связано с необходимостью минимизации времени анализа, особенно в случаях тяжелого сепсиса и сепсиса новорожденных. На момент подготовки обзора коммерчески доступными были пять тест-систем для прямой диагностики сепсиса на основе ПЦР-РВ. В табл. 2 представлены основные характеристики этих тестов. Очень высокая стоимость зарубежных наборов делает их недоступными для широкого применения в российских лабораториях и повышает актуальность современных российских разработок.

В Российской Федерации на сегодняшний день для выявления генетических маркеров антибиотикорезистентности микроорганизмов методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией используются 3 отечественные тест-системы: для выявления метициллинрезистентности стафилококков «АмплиСенс®MRSA-FL», для выявления генов карбапенемаз групп KPC и OXA-48, характерных для энтеро-бактерий, «АмплиСенс®MDR KPC/OXA-48-FL» и для выявления генов металло-β-лактамаз групп VIM, IMP и NDM «АмплиСенс®MDR MBL-FL». Преимуществом данных наборов является возможность анализировать различные образцы — чистые культуры, гемокультуры, посев ликвора на среду обогащения, а также исходный биологический материал (например, мочу при острых инфекциях мочевыводящих путей или мазки со слизистых оболочек ротоглотки), что делает их незаменимым инструментом при проведении скрининга или эпидемиологических исследований. В клиническом исследовании образцов, полученных от пациентов с инфекцией в области хирургической раны после кардиохирургического вмешательства, чувствительность и специфичность тест-системы «АмплиСенс®MRSA-FL» составила 98,6 и 95,8% соответственно. В случае выделения MRSA и MSSA совпадение с микробиологическими методами отмечено в 100% [2]. Тесты для выявления генетических маркеров антибиотикорезистентности «АмплиСенс®MRSA-FL», «АмплиСенс®MDR KPC/OXA-48-FL» и «АмплиСенс®MDR MBL-FL» зарегистрированы и прошли клинические испытания на территории Российской Федерации, что позволяет уже сейчас использовать их в лабораторной практике.

Перспективные разработки в области молекулярной диагностики для детекции возбудителей сепсиса. С учетом необходимости адаптации методов молекулярной диагностики к рутинному использованию в клинических лабораториях в качестве перспективных разработок для этиологической диагностики сепсиса следует отметить следующие полностью автоматизированные решения на базе ПЦР-РВ: VAPChip компании Eppendorf Array Technologies (Бельгия), T2Bacteria и T2Candida компании T2Biosystems (США), PLEX-ID компании Abbott Molecular (США). Все эти тест-системы разработаны для прямого анализа клинических образцов крови, но в настоящее время доступны только для исследовательских целей.

В качестве перспективной методики рассматривается сэнгеровское секвенирование смеси ПЦР-продуктов с последующим математическим анализом смешанных хроматограмм, который позволяет идентифицировать последовательности, принадлежащие различным микроорганизмам без физического разделения ампликонов. Такой анализ реализован в форме Интернет-сервиса Ripseq норвежской компанией Isentio [22], продемонстрировано его успешное применение в диагностике сепсиса в комплексе с тест-системой SepsisTest [19]. Альтернативный алгоритм анализа хроматограмм предложен группой из ЦНИИЭ [15].

Помимо указанных пост-амплификационных тестов к перспективным разработкам в области молекулярной диагностики сепсиса можно отнести так называемые супер-мультиплексные тест-системы на базе асимметричной ПЦР-РВ, позволяющие детектировать 17 видов возбудителей сепсиса в одной реакционной смеси с молекулярными маячками (molecular beacons) в качестве зондов [36]. К настоящему времени эти тест-системы еще не прошли клинические испытания.

Возможности использования технологии Illumina Miseq были продемонстрированы при расследовании двух вспышек нозокомиальных инфекций, вызванных ванкомицин-резистентным штаммом *Enterococcus faecium* и карбапенем-резистентным штаммом *Enterobacter cloacae*. Применение полногеномного секвенирования позволило за короткое время (сутки) типировать антибиотикорезистентные штаммы и штаммы, не связанные с расследуемыми вспышками и являющиеся контаминантами ранее полученных гемокультур. Анализ геномных данных позволил также выявить основные механизмы антибиотикорезистентности возбудителей. При этом результаты молекулярной и микробиологической диагностики совпадали. Таким образом, была наглядно продемонстрирована высокая диагностическая достоверность молекулярной диагностики с применением полногеномного секвенирования [35].

В настоящее время в стадии клинической апробации находится разработанная в ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора панель мультиплексных ПЦР-РВ тестов для диагностики этиологии сепсиса, позволяющая идентифицировать и определять содержание ДНК грамотрицательных бактерий (*Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas*

aeruginosa, Enterobacteriaceae spp.), грамположительных бактерий (*Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp.), грибов рода *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*/*C. parapsilosis*). Кроме того, панель включает тест на выявление метициллинрезистентных стафилококков [4] и мультиплексные ПЦР-тесты для выявления генов карбапенемаз (охватывают все основные группы карбапенемаз, имеющие распространение в России, Европе и/или глобальное распространение). Тесты позволяют получить информацию о возможных возбудителях и антибиотикорезистентности патогенов уже через 1,5 — 3 часа. Возможен анализ различных образцов: чистых культур, гемокультур и непосредственно образцов крови.

Ключевыми преимуществами всех современных методов молекулярной диагностики возбудителей сепсиса являются значительное сокращение времени анализа по сравнению с традиционными микробиологическими методами, возможность детекции некультивируемых и медленно растущих микроорганизмов, возможность детекции патогенов после начала антибиотикотерапии. Помимо этого, молекулярные методы и, особенно ПЦР-анализ, имеют широкие возможности мультиплексирования, т.е. одновременной детекции и идентификации многих мишеней, включая факторы антибиотикорезистентности бактерий, что особенно актуально в свете стремительно возрастающей доли устойчивых штаммов в этиологической структуре сепсиса в последние годы [33]. В свою очередь, сокращение времени диагностики за счет использования молекулярных методов существенно уменьшает длительность эмпирической терапии и увеличивает эффективность лечения, что, в конечном счете, приводит к снижению общих затрат на лечение [28]. Однако до сих пор ни один из клинически валидированных молекулярных методов не является «золотым стандартом» детекции возбудителей сепсиса, полностью альтернативным гемокультуривированию. Причинами этого являются сложность обучения персонала, высокая стоимость оборудования, влияние контаминирующей ДНК на результаты теста и, как следствие, повышенные требования к чистоте реактивов, расходных материалов и рабочих помещений. Кроме того, результаты ПЦР-тестов существенно зависят от стадии пробоподготовки. Оптимальный метод экстракции НК должен быть достаточно селективным для получения препарата ДНК бактерий и грибов без ингибирующих концентраций ДНК человека и ингибиторов ПЦР, при этом потери микробных НК должны быть минимальны.

Несмотря на ряд проблем, ограничивающих широкое применение методов молекулярной диагностики, предоставляемые ими преимущества значительного ускорения времени анализа и расширения спектра детектируемых мишеней стимулируют создание нового «золотого стандарта» диагностики возбудителей сепсиса на молекулярно-биологической основе. Развитие этих методов ведется по направлению снижения удельной стоимости анализа за счет создания полностью автоматизированных решений с большой производительностью и минимальным временем работы оператора, таких как ПЦР-тесты Verigene, Prove-it, Film Array, VAPChip, серии GeneXpert и T2Biosystems. Однако этот вариант тест-систем создает проблему зависимости от одного типа оборудования, предоставляемого производителем теста. Альтернативным решением является разработка мультиплексных тестов, позволяющих выявлять широкий спектр мишеней без привязки к одному типу оборудования.

Решение проблемы низкой чувствительности, отмеченной для ряда ПЦР-тестов при прямом анализе цельной крови, непосредственно связано с повышением селективности и полноты экстракции микробной ДНК. Методики молекулярного анализа гемокультур не подразумевают повышенных требований к процедуре пробоподготовки. Кроме того, предварительное гемокультуривирование позволяет накопить клетки потенциального возбудителя и, тем самым, повысить вероятность его детекции, а значит, и чувствительность диагностики в целом. Однако при такой стратегии анализа сохраняется зависимость от культуральных методов, не позволяющая выявлять некультивируемые или медленно растущие микроорганизмы. Альтернативным решением по повышению чувствительности ПЦР-диагностики является применение больших объемов биологического материала, хотя такая стратегия не применима для случаев неонатального сепсиса.

Очевидна значительная востребованность молекулярных методов этиологической диагностики сепсиса, что делает перспективными активные работы по разработке новых тестов, совершенствованию уже имеющихся и регистрации таких технологий в Российской Федерации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Грувер К.П., Белобородов В.Б., Кузьменко Т.Н. Актуальные аспекты сепсиса. Антибиотики и химиотерапия. 2011, 56 (3-4): 35-40.
2. Ильина В.Н., Субботовская А.И., Князькова Л.Г., Козырева В.С., Скачкова Т.С., Шипулина О.Ю., Сергеевичев Д.С., Субботовский А.П. Применение молекулярно-биологических методов исследования для диагностики инфекции области хирургического вмешательства, вызванной бактериями рода *Staphylococcus*. Патология кровообращения и кардиохирургия. 2011, 4: 43-46.
3. Савельев В.С., Гельфанд Б.Р. (ред.) Сепсис в начале XXI века. Классификация, клинико-диагностическая концепция и лечение. Патолого-анатомическая диагностика. Практическое руководство. М, 2006.
4. Скачкова Т.С., Шипулина О.Ю., Домонова Э.А. и др. Разработка и апробация набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК метициллинчувствительного и метициллинрезистентного *Staphylococcus aureus*, а также метициллинрезистентных коагулазонегативных *Staphylococcus spp.* методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени». Клиническая лабораторная диагностика. 2013, 6: 42-45.
5. Avolio M., Diamante P., Modolo M.L. et al. Direct molecular detection of pathogens in blood as specific rule-in diagnostic biomarker in patients with presumed sepsis: our experience on a heterogeneous cohort of patients with signs of infective systemic inflammatory response syndrome. *Shock*. 2014, 42 (2): 86-92.
6. Bauer K.A., West J.E., Balada-Llasat J.-M. et al. An antimicrobial stewardship program's impact with rapid polymerase chain reaction methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*/*S. aureus* blood culture test in patients with *S. aureus* bacteremia. *Clin. Infect. Dis.* 2010, 5: 1074-1080.
7. Becker K., Larsen A.R., Skov R.L. et al. Evaluation of a modular multiplex-PCR methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* detection assay adapted for *mecC* detection. *J. Clin. Microbiol.* 2013, 51 (6): 1917-1919.
8. Blaschke A.J., Heyrend C., Byington C.L. et al. Rapid identification of pathogens from positive blood cultures by multiplex polymerase chain reaction using the Film Array system. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2012, 74 (4): 349-355.
9. Bloos F., Sachse S., Kortgen A. et al. Evaluation of a polymerase chain reaction assay for pathogen detection in septic patients under routine condition: an observational study. *PLoS One*. 2012, 7 (9): e46003.
10. Burdino E., Ruggiero T., Aliche T. et al. Combination of conventional blood cultures and the SeptiFast molecular test in patients with suspected sepsis for the identification of bloodstream pathogens. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2014, 79 (3): 287-292.
11. Carrara L., Navarro F., Turbau M. et al. Molecular diagnosis of bloodstream infections with a new dual priming oligonucleotide-based multiplex PCR assay. *J. Med. Microbiol.* 2013, 62: 1673-1679.
12. Chang S.-S., Hsieh W.-H., Liu T.-S. et al. Multiplex PCR system for rapid detection of pathogens in patients with presumed sepsis — a systemic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2013, 8 (5): e62323.
13. Clerc O., Prod'homme G., Vogne C. et al. Impact of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry on the clinical management of patients with Gram-negative bacteremia: a prospective observational study. *Clin. Infect. Dis.* 2013, 56: 1101-1107.
14. Drancourt M. Detection of microorganisms in blood specimens using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a review. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010, 16: 1620-1625.
15. Fantin Y.S., Neverov A.D., Favorov A.V. et al. Base-Calling Algorithm with Vocabulary (BCV) method for analyzing population sequencing chromatograms. *PLoS One*. 2013, 8 (1): e54835.
16. Fast-track diagnostics. FTD neonatal sepsis. Manual. 2012, V1.
17. Forrest G.N. PNA FISH: present and future impact on patient management. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2007, 7: 231-236.
18. Gescher D.M., Kovacevic D., Schmiedel D. et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) accelerates identification of Gram-positive cocci in positive blood cultures. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 2008, 32 (S1): S51-S59.
19. Haag H., Locher F., Nolte O. Molecular diagnosis of microbial aetiologies using SepsiTTM in the daily routine of a diagnostic laboratory. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2013, 76 (4): 413-418.
20. Jarvinen A.K., Laakso S., Piiparinen P. et al. Rapid identification of bacterial pathogens using a PCR- and microarray-based assay. *BMC Microbiol.* 2009, 9: 161.

21. Kasper D.C., Altiok I., Mechtler T.P. et al. Molecular detection of late-onset neonatal sepsis in premature infants using small blood volumes: proof-of-concept. *Neonatology*. 2013, 103 (4): 268-273.
22. Kommedal O., Karlsen B., Saebo O. Analysis of mixed sequencing chromatograms and its application in direct 16s rRNA gene sequencing of polymicrobial samples. *J. Clin. Microbiol.* 2008, 46: 3766-3771.
23. Lebovitz E.E., Burbelo P.D. Commercial multiplex technologies for the microbiological diagnosis of sepsis. *Mol. Diagn. Ther.* 2013, 17 (4): 221-231.
24. Lee A., Mirrett S., Reller L.B., Weinstein M.P. Detection of bloodstream infections in adults: how many blood cultures are needed? *J. Clin. Microbiol.* 2007, 45: 3546-3548.
25. Leggieri N., Rida A., François P., Schrenzel J. Molecular diagnosis of bloodstream infections: planning to (physically) reach the bedside. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2010, 23: 311-319.
26. Lehmann L.E., Alvarez J., Hunfeld K.-P. et al. Potential clinical utility of polymerase chain reaction in microbiological testing for sepsis. *Crit. Care Med.* 2009, 37 (12): 3085-3090.
27. Lehmann L.E., Herpichboehm B., Kost G.J. et al. Cost and mortality prediction using polymerase chain reaction pathogen detection in sepsis: evidence from three observational trials. *Crit. Care*. 2010, 14: R186.
28. Liesenfeld O., Lehman L., Hunfeld K.-P. et al. Molecular diagnosis of sepsis: new aspects and recent developments. *Europ. J. Microbiol. Immunol.* 2014, 4 (1): 1-25.
29. Lindholm L., Sarkkinen H. Direct identification of gram-positive cocci from routine blood cultures by using AccuProbe tests. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42: 5609-5613.
30. Mancini N., Carletti S., Ghidoli N. et al. The era of molecular and other non-culture-based methods in diagnosis of sepsis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2010, 23: 235-251.
31. Mencacci A., Leli C., Montagna P. et al. Diagnosis of infective endocarditis: comparison of the LightCycler SeptiFast real-time PCR with blood culture. *J. Med. Microbiol.* 2012, 61 (6): 881-883.
32. Paolucci M., Capretti M.G., Dal Monte P. et al. Laboratory diagnosis of late-onset sepsis in newborns by multiplex real-time PCR. *J. Med. Microbiol.* 2009, 58: 533-534.
33. Pendleton J.N., Gorman S.P., Gilmore B.F. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2013, 11 (3): 297-308.
34. Poritz M.A., Blaschke A.J., Byington C.L. et al. FilmArray, an automated nested multiplex PCR system for multi-pathogen detection: development and application to respiratory tract infection. *PLoS One*. 2011, 6: e26047.
35. Reuter S., Ellington M.J., Cartwright E.J. et al. Rapid bacterial whole-genome sequencing to enhance diagnostic and public health microbiology. *JAMA Intern. Med.* 2013, 173 (15): 1397-1404.
36. Rice L.M., Reis A.H.Jr., Ronish B. et al. Design of a single-tube, endpoint, linear-after-the-exponential-PCR assay for 17 pathogens associated with sepsis. *J. Appl. Microbiol.* 2013, 114: 457-469.
37. Schreiber J., Nierhaus A., Braune S.A. et al. Comparison of three different commercial PCR assays for the detection of pathogens in critically ill sepsis patients. *Med. Klin. Intensivmed. Notfmed.* 2013, 108 (4): 311-318.
38. Shah S.S., Downes K.J., Elliott M.R. et al. How long does it take to «rule out» bacteremia in children with central venous catheters? *Pediatrics*. 2008, 121: 135-141.
39. Storhoff J.J., Lucas A.D., Garimella V. et al. Homogeneous detection of unamplified genomic DNA sequences based on colorimetric scatter of gold nanoparticle probes. *Nat. Biotechnol.* 2004, 22 (7): 883-887.
40. Tissari P., Zumla A., Tarkka E. et al. Accurate and rapid identification of bacterial species from positive blood cultures with a DNA-based microarray platform: an observational study. *Lancet*. 2010, 375 (9710): 224-230.
41. Torres-Martos E., Perez-Ruiz M., Pedrosa-Corral I. et al. Evaluación de la técnica LightCycler® SeptiFast en recién nacidos y lactantes con sospecha de sepsis. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.* 2013, 31 (6): 375-379.
42. Vlek A.L.M., Bonten M.J.M., Boel C.H.E. Direct matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry improves appropriateness of antibiotic treatment of bacteremia. *PLoS One*. 2012, 7 (3): e32589.
43. Wellinghausen N., Wirths B., Essig A. et al. Evaluation of the hyplex bloodscreen multiplex PCR-enzyme-linked immunosorbent assay system for direct identification of gram-positive cocci and gram-negative bacilli from positive blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42: 3147-3152.

Поступила 27.05.15

Контактная информация: Скачкова Татьяна Сергеевна,
111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а, р.т. (495) 672-11-58

РОЛЬ ФАКТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА В ПАТОГЕНЕЗЕ ПАРОДОНТИТА

¹Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, ²НИИ вакцин и сывороток им.И.И. Мечникова, Москва

Хронический генерализованный пародонтит (ХГП) — индуцированное бактериями заболевание тканей пародонта, поддерживающих зуб, которое характеризуется наличием процессов воспаления с разрушением костной ткани. Знание молекулярных механизмов патогенеза ХГП способствует созданию наиболее эффективных методов лечения данного заболевания. Бактериальная инфекция является первичным фактором в этиологии пародонтита, но не достаточным для его начала и последующего развития. Известно, что бактериальные факторы индуцируют местную воспалительную реакцию и активируют систему врожденного иммунитета через активацию Toll-подобных рецепторов (TLR), расположенных на поверхности резидентных клеток и лейкоцитов. Активация этих клеток приводит к выработке провоспалительных цитокинов и привлечению в зону воспаления фагоцитов и лимфоцитов. В обзоре мы рассматриваем известные данные о факторах иммунной защиты пародонта включая клеточные популяции и цитокины, а также механизмы разрушения тканей, поддерживающих зуб. Также обсуждаются перспективы лечения.

Журн. микробиол., 2016, № 2, С. 100—107

Ключевые слова: врожденный иммунитет, пародонтит, TLR, цитокины

L.V.Gankovskaya¹, N.M.Khelminskaya¹, E.A.Molchanova¹, O.A.Svitich²

ROLE OF INNATE IMMUNITY FACTORS IN PERIODONTITIS PATHOGENESIS

¹Pirogov Russian National Research Medical University, ²Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Chronic generalized periodontitis (CGP) is a disease of periodontium tissues supporting tooth induced by bacteria, that is characterized by the presence of processes of inflammation with destruction of bone tissue. The knowledge of molecular mechanisms of CGP pathogenesis facilitates creation of the most effective methods of therapy of this disease. Bacterial infection is a primary factor in periodontitis etiology, however is not sufficient for its start and subsequent development. It is known, that bacterial factors induce a local inflammation reaction and activate the system of innate immunity through activation of Toll-like receptors (TLR), located on the surface of resident cells and leukocytes. Activation of these cells results in production of pro-inflammatory cytokines and recruitment of phagocytes and lymphocytes into the inflammation zone. In review we examined the known data regarding factors of immune protection of periodontium including cell populations and cytokines, as well as mechanisms of tissue destruction, that support the tooth. Perspectives of therapy are also discussed.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 2, P. 100—107

Key words: innate immunity, periodontitis, TLR, cytokines

Пародонтит — воспалительное заболевание тканей, окружающих зуб, относится к числу болезней, известных с древнейших времен. Согласно имеющимся оценкам около 75% взрослого населения развитых стран страдают пародонтитом в той или иной форме. Уровень заболеваемости в развивающихся странах еще выше, хотя и не поддается точному статистическому учету. Этому заболеванию также в значительной степени подвержены

и дети разных возрастных групп. Общемедицинская и социальная значимость заболеваний пародонта определяется их распространенностью в мире, большим процентом связанной с ними потери зубов и отрицательным влиянием пародонтальных очагов инфекции на организм в целом [1]. В связи с этим, важнейшее значение приобретает разработка новых эффективных подходов к ранней диагностике, профилактике и лечению пародонтита.

К настоящему времени исследована этиология, патогенез и способы лечения пародонтита. Хорошо изучены различные формы этого заболевания, стадии развития, гистологические изменения и другие особенности течения патологического процесса [4]. Однако нет полной информации о причинах возникновения и развития пародонтита.

Особую роль в защите организма от инфекционных агентов, которые вызывают пародонтит, играет врожденный иммунитет, который принимает на себя первый удар [5]. К настоящему времени, благодаря появлению в последние годы новейших технологий, знания об особенностях функционирования иммунной системы на молекулярно-клеточном уровне в процессе развития пародонтита существенно расширились.

Пародонтом называется комплекс тканей, окружающих зуб. В состав пародонта входят периодонт, костное ложе альвеолярного отростка челюсти, десна с прилегающей надкостницей и внешние ткани зуба [1, 4]. Важнейшим элементом пародонта, в котором разворачиваются первичные этапы развития пародонтита и взаимодействие патогенов с факторами иммунной системы, является десна. Важной особенностью эпителия десны является повышенная регенеративная активность клеток базального и шиповидного слоев. Клетки эпителия десны плотно соединяются друг с другом с помощью специального связывающего вещества, преимущественно состоящего из гликозаминогликанов, что является основой выполнения эпителием десны функции механической защиты, препятствующей физическому проникновению в организм бактерий и токсинов. Эпителий борозды и соединительный эпителий совместно обеспечивают надежную защиту тканей пародонта от воздействий внешних патогенных факторов со стороны полости рта. Нарушение по тем или иным причинам связи соединительного эпителия с эмалью зуба приводит к утрате этой защитной функции и, в конечном счете, к образованию пародонтального кармана. Обычно причиной пародонтита является хроническая инфекция, постепенно разрушающая твердые и мягкие ткани, удерживающие зубы. Симптомами пародонтита являются боль, воспаление десны, часто сопровождаемое кровотечением. Причиной пародонтита могут быть более 400 видов бактерий [26]. Несмотря на то, что изначальной причиной пародонтита является бактериальная инфекция, связанные с этим заболеванием повреждения тканей пародонта обусловлены иммунным ответом на ее воздействие [20]. Известно, что бактерии, вызывающие пародонтит, выработали два механизма патогенной эффективности против макроорганизма. Первый из них проявляют *Porphyromonas gingivalis*, которые инициируют апоптоз лимфоцитов, обеспечивая, таким образом, более широкое распространение инфекции и серьезное поражение тканей пародонта. Второй механизм связан со способностью пародонтальных бактерий продуцировать суперантигены [48], которые активируют Т-лимфоциты, связываясь с молекулами МНС II класса. Для развития пародонтита помимо микробных патогенов требуется наличие ряда других факторов, вовлеченных в патогенез, таких как высокий уровень провоспалительных цитокинов, металлопротеиназа матрикса (MMPs), простагландин E2 (PGE2). Также важную роль играет снижение уровня противовоспалительных цитокинов, включая интерлейкин-10 (IL-10), трансформирующий фактор роста β (TGF- β) и тканевые ингибиторы MMPs (TIMPs) [17, 37]. Эпителий пародонта, находясь в постоянном контакте с патогенами в полости рта, выполняет также функции прямого физического барьера, препятствующего проникновению инфекции в глубокие ткани, и участвует в активации системы врожденного иммунитета [13, 36]. В случае, когда эпителий не выполняет барьерную функцию, в нем образуются глубокие пародонтальные карманы, через которые инфекция попадает во внутреннюю среду организма, инициируя процесс воспаления, часто приводящий к разрушению соединительной и костной ткани и, как следствие, к последующей потере зубов.

К числу резидентных клеток, принимающих участие во врожденном иммунном ответе, относятся [6] эпителиальные клетки, десневые фибробласты и фибробласты пародонталь-

ных связок, остеобласты и дендритные клетки [20]. Эпителиальные клетки продуцируют интерлейкин-8 (IL-8), хемоаттрактант нейтрофилов, который обеспечивает миграцию нейтрофилов и усиливает адгезию моноцитов в кровеносных сосудах. Нейтрофилы, которые проникают в область пародонта, в первую очередь начинают вырабатывать большое количество провоспалительных цитокинов, таких как IL-1, IL-6 и TNF- α [45]. Эти цитокины опосредованно участвуют в разрушении ткани пародонта путем стимулирования процесса резорбции кости. Моноциты, с другой стороны, могут дифференцироваться в остеокласты под действием разных пусковых факторов, продолжая при этом продуцировать воспалительные цитокины [35].

С дендритными клетками внедряющиеся микроорганизмы сталкиваются сразу же, как только преодолевают эпителиальный барьер. Эти клетки активируют иммунный ответ, выполняя функции антиген-презентирующих клеток и путем выработки IL-12 и IL-18, которые в дальнейшем способствуют секреции интерферона- γ (IFN- γ) NK-клетками, а затем и Т-лимфоцитами [44]. Фибробласты пародонтальных связок и десневые фибробласты являются основными клетками соединительной ткани пародонта и вступают в контакт с микроорганизмами, как только тем удастся нарушить эпителиальный барьер. Их реакция заключается в высвобождении цитокинов и MMP. Десневые фибробласты продуцируют TNF- α , IL-6, IL-8 и другие эффекторные молекулы, которые являются важными регуляторами воспалительного процесса и процесса метаболизма кости [7, 15, 18, 34]. В фибробластах пародонтальных связок наблюдается усиление экспрессии матричных металлопротеиназ. В то же время, эти клетки оказывают свой вклад в воспаление пародонта и разрушение кости с участием IL-1 β , IL-6, TNF- α , а также путем продуцирования и высвобождения лиганда, активирующего рецептор ядерного фактора κ B (RANKL) [27, 34, 39, 42].

В процессе вторжения микроорганизмы могут все глубже проникать в ткани пародонта и достигать поверхности кости. Было показано, что *P. gingivalis* способен проникать в остеобласты путем интегрирования с белком интегрин α 5 β 1, вызывая конденсацию актина, активацию сигнального пути JNK и апоптоз остеобластов [49, 50]. Тем не менее, микробные PAMPs способствуют экспрессии проостеокластогенерирующего цитокина RANKL в остеобластах, инициирующего таким образом процесс остеокластогенезиса [28, 43]. Все эти события, которые представляют собой первичную реакцию на внедрение инфекции, составляют картину локального воспаления с участием факторов врожденного иммунитета.

Врожденный иммунитет характеризуется способностью определять бактерии как чужие агенты, потому что эти микроорганизмы имеют характерные молекулярные комплексы PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) в своей структуре, которые обнаруживаются соответствующими паттерн-распознающими рецепторами (PRRs), расположенными на мембранах иммунных клеток. PAMPs представляют собой устойчивые инвариантные или консервативные молекулярные комплексы, которые необходимы микробам для выживания в окружающей среде. Они могут обнаруживаться в бактериальных липопептидах, пептидогликане, ДНК и могут быть специфичными как для грамотрицательных (липополисахариды), так и для грамположительных (пептидогликаны) бактерий [8, 14]. Врожденный иммунный ответ организма-хозяина активируется, прежде всего, с участием TLR [21], которые экспрессируются на клетках, относящихся к системе врожденного иммунитета [23], однако встречаются и непосредственно в тканях пародонта [9]. Каждый из этих рецепторов распознает свой уникальный молекулярный комплекс, который является характерной молекулярной структурой для конкретных классов патогенов. Имеются сведения, что TLR2 способен распознавать некоторые атипичные изоформы липополисахаридов бактерий *Leptospira interrogans* и *P.gingivalis*. TLR9 распознает метилированные мотивы CpG, расположенные в геноме бактериальной и вирусной ДНК [24, 30]. Эффективность распознавания может определяться индивидуальными особенностями экспрессии TLRs на клетках различных тканей и клетках врожденного иммунитета, а также способностью этих клеток эффективно реагировать в соответствии с получаемыми сигналами, что, в первую очередь, обеспечивается внутриклеточными каскадами сигнальных молекул, вовлеченных в процесс передачи информации от TLR к ядру клетки. Нарушение этих механизмов изменяет реакцию системы врожденного иммунитета, делая

ее неэффективной, а в некоторых случаях и патологической. Распознавание патогенов рецепторами TLRs, расположенными на эпителиальных клетках и клетках врожденного иммунитета, вызывает продукцию противомикробных пептидов, цитокинов и хемокинов, оказывающих противомикробное действие, а также привлекающих большее число клеток иммунной системы в очаг инфекционного поражения [3, 8, 22].

В настоящее время хорошо известно, что эпителий, являющийся составной частью различных органов, продуцирует большое разнообразие противомикробных пептидов, которые в организме человека представлены, по крайней мере, четырьмя семействами: α -дефенсины, β -дефенсины, кателицидины и сапосины [2]. Этот структурный барьер представляет собой часть системы врожденного иммунитета, которая противодействует бактериальной и вирусной инфекции. Помимо защитной функции кератиноциты при активации секретируют цитокины, хемокины и противомикробные пептиды в ответ на воздействие продуктов жизнедеятельности бактерий [4]. Некоторые виды противомикробных пептидов, включая β -дефенсины, кателицидин и CCL20/MIP-3a, могут продуцироваться кератиноцитами [2, 40].

В последнее десятилетие было открыто и описано большое число представителей β -дефенсинов человека [12]. Некоторые из них играют определенную роль в защитном механизме полости рта и, возможно, могли бы проявить терапевтический эффект при повреждении эпителия полости рта. Эти пептиды определяются в слюне и области зубодесневого соединения. Эпителий десневой борозды и соединительный эпителий преимущественно экспрессируют дефенсины, а именно, β -дефенсины — hBD-1, hBD-2 и hBD-3 [13]. Множество различных пептидов и белков, обладающих свойствами природных антибиотиков, экспрессируется клетками эпителия десны и нейтрофилами, присутствующими в нем. Действие этих белков направлено против грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также против дрожжей и некоторых вирусов. Их противомикробные свойства основаны на способности взаимодействовать с анионной поверхностью микроорганизмов с последующей ее структурной трансформацией, завершающейся образованием пор или прямым нарушением целостности микробной мембраны, хотя последние исследования указывают на то, что у этих белков есть и внутриклеточные мишени. Действие данных пептидов дополняет активность других противомикробных факторов слюны, таких как гистатины, лизоцим и секреторные иммуноглобулины, которые выполняют свою специфическую роль во врожденных механизмах защиты организма от инфекции [8]. Исследования, посвященные изучению продукции противомикробных пептидов (ПМП), показывают, что недостаточная выработка ключевых ПМП может быть важнейшим фактором, определяющим хроническое персистирование инфекции на слизистых оболочках [47]. Однако причина такой недостаточности до сих пор остается не изученной. Возможно, имеет место определенная генетическая предрасположенность отдельных лиц, имеющих мутации в генах ПМП.

Известно, что взаимодействие TLRs с микроорганизмами также является необходимым фактором поддержания гомеостаза в эпителии десны и ротовой полости [40]. Бактериальные липополисахариды могут также взаимодействовать с рецепторами макрофагов и дендритных клеток, такими как CD14 и TLRs, что приводит к продуцированию провоспалительных цитокинов и других медиаторов этими клетками [8]. Несбалансированная продукция медиаторов воспаления, недостаточность выработки противовоспалительных цитокинов и противомикробных пептидов могут являться важнейшим звеном патогенеза пародонтита. Согласно литературным данным, цитокины, секретируемые активированными клетками врожденного иммунитета в области тканей пародонта, играют ключевую роль в поддержании хронического воспаления, а также в стимуляции патологических процессов, приводящих к деструкции тканей пародонта. Однако недавно было также показано, что ряд цитокинов, преимущественно образующихся при патологических условиях, принимают определенное участие в модулировании процесса остеокластогенеза.

Разрушающие кость клетки остеокласты дифференцируются под сложным контролем системы RANK/RANKL/OPG. RANKL экспрессируется остеобластами, а также рядом клеток других типов, включая фибробласты, T- и B-лимфоциты. В патологических условиях, например, имеющих место при пародонтите, наблюдается нарушение процесса продукции этих цитокинов. Остеобласты экспрессируют TLR1, 2, 4 и 6 и взаимодейству-

ют с лигандами TLR2/6 и TLR2/1, что приводит к активации NFκB и повышению уровня экспрессии RANKL [33]. Другие исследования показывают, что липополисахарид бактерий *P. endodontales* обладает способностью усиливать экспрессию RANKL в остеобластах мыши с использованием преимущественно сигнального пути TLR2/4-JNK [44]. Экспрессия фибробластами RANKL в обычных физиологических условиях является низкой. Однако его экспрессия усиливается под воздействием токсина, выделенного из *Agregatibacter actinomycetemcomitans*, и при наличии липополисахарида *P. gingivalis* [29, 38]. Однако наиболее продуктивным источником RANKL при пародонтите являются клетки иммунной системы. RANKL-позитивные лимфоциты обнаруживаются в воспаленной соединительной ткани десны [31]. Кроме того, циркулирующие Т-клетки также экспрессируют высокий уровень RANKL и тем самым спонтанно усиливают остеокластогенез у больных пародонтитом [10].

Действие RANKL может быть блокировано его собственным псевдоресептором — остеопротегерином (ОПГ), количество которого уменьшается при пародонтите, что приводит к увеличению соотношения RANKL/ОПГ. В нормальных здоровых условиях ОПГ продуцируется резидентными фибробластами и эндотелиальными клетками. Иммуногистохимические исследования показывают значительно меньшее количество ОПГ в тканях, пораженных пародонтитом, в сравнении со здоровыми тканями десны, а данные по генной экспрессии демонстрируют меньший уровень экспрессии ОПГ при пародонтите, чем у здоровых пациентов [11].

Другие цитокины, например TNF-α, могут действовать синергично с RANKL, способствуя процессу остеокластогенеза. Последние исследования показывают, что в макрофагах человека TNF-α активирует сигнальный путь с участием c-Jun, NFκB и кальция, приводящий к активации NFATc1 с последующей дифференцировкой остеокластов, не зависящей от RANKL [46]. TNF-α играет центральную роль в воспалительной реакции, резорбции альвеолярной кости и нарушении взаимодействия элементов соединительной ткани. Известно, что этот фактор ассоциирован с местным и системным воспалительным процессами, приводящими к разрушению кости [19]. Он присутствует в высоких концентрациях в пораженных заболеванием тканях пародонта, где его концентрация положительно коррелирует с экспрессией RANKL [16, 19, 41].

Экспериментальное исследование пародонтита на приматах показало, что местные инъекции антагонистов TNF-α отдалают по сроку появление воспалительных клеток в альвеолярной кости и возникновение разрушающих кость остеокластов. В результате активации врожденного иммунитета TNF-α местно продуцируется нейтрофилами, которые в условиях возросшего хемотаксиса демонстрируют увеличенное продуцирование провоспалительных цитокинов [45]. Макрофаги, которые в норме являются активным источником TNF-α, в состоянии нарушения управления вносят свой вклад в разрушение тканей организма.

Помимо медиаторов воспаления в патогенез пародонтита могут быть вовлечены и противовоспалительные медиаторы. Так, TGF-β, являющийся противовоспалительным цитокином, способен снижать активность воспалительных факторов разрушения соединительной ткани [25, 32]. Однако по данным литературы, и TGF-β может играть значимую роль в развитии хронического воспаления. TGF-β способен усиливать хемотаксис множества клеток иммунной системы, таких как нейтрофилы, моноциты и лимфоциты за счет увеличения экспрессии интегринов на их мембране. Это может приводить к длительному присутствию указанных клеток в очаге, что приводит к хроническому течению воспалительного процесса. Кроме того, проводились исследования, показывающие, что повышенная продукция TGF-β может способствовать разрастанию тканей десны, в том числе способствовать развитию фиброза что может быть фактором, увеличивающим тяжесть заболевания [47].

Таким образом, можно заключить, что развитие пародонтита обусловлено многими факторами. Это заболевание имеет полимикробный патогенез, так как различные виды бактерий могут являться инициаторами воспалительного процесса. Первой линией защиты против инфекции является врожденный иммунитет, основу действия которого составляют Toll-подобные рецепторы, распознающие молекулярные структуры, характерные для патогенных бактерий; дефенсины, которые проявляют свое противомикроб-

ное действие против различных микроорганизмов. Широкая сеть секретируемых цитокинов приводит к активации лимфоцитов. В результате дисбаланса функционирования различных популяций клеток этого типа, отвечающих за экспрессию молекул с различной целевой активностью, наступает расширение очага поражения пародонта.

Многие из числа указанных секретируемых факторов принимают участие в поддержании физиологического состояния костной ткани, и их рассогласованное действие может приводить к изменению состояния костной ткани, входящей в состав пародонта. Таким образом, усиление активности остеокластов без одновременного ускорения обновления костной ткани может приводить к постепенному разрушению кости.

Механическое удаление инфекционных агентов из десневых карманов — стимуляторов врожденного иммунитета, является в настоящее время единственным способом лечения пародонтита. Данный подход направлен на ослабление воспаления и уменьшение повреждения тканей. Однако сложность и многообразие путей реакции организма определяют различия в клинической картине и характере развития заболевания, что, очевидно, предполагает различные подходы к его лечению. Важным аспектом является правильное понимание роли многочисленных медиаторов воспалительного процесса, их происхождения в различных типах клеток, мест их основного действия и, возможно, способов их контроля.

ЛИТЕРАТУРА

1. Боровский Е.В., Иванов В.С., Максимовский Ю.М. и др. Терапевтическая стоматология. М., Медицина, 1998.
2. Иванюшко Т.П., Ганковская Л.В., Шаманаев С.В. и др. Изучение содержания дефенсинов у больных с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области. Стоматология. 2014, 93 (2): 23-26.
3. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Мироншиченкова А.М. и др. Роль Toll-подобных рецепторов в патогенезе инфекционных заболеваний человека. Человек и его здоровье. 2012, 2: 147-153.
4. Курякина Н.В., Кутепова Т.Ф. Заболевания пародонта. М., Медицинская книга, 2003.
5. Свитич О.А., Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В. и др. Аналитический подход в изучении противовирусного и иммуномодулирующего действия препаратов на модели герпесвирусной инфекции *in vitro*. Российский иммунологический журнал. 2013, 4: 377-384.
6. Adriana D. B., Gigante I., Colucci S. Periodontal disease: Linking the primary inflammation to bone loss. 2013, doi: 10.1155/2013/503754.
7. Ara T., Kurata K., Hirai K. et al. Human gingival fibroblasts are critical in sustaining inflammation in periodontal disease. J. Periodontal Research. 2009, 1: 21-27.
8. Bascones-Martínez A., Muñoz-Corcuera M., Noronha S. et al. Host defence mechanisms against bacterial aggression in periodontal disease: Basic mechanisms. Med. Oral. Patol. Oral. Cir. Bucal. 2009, 14: 680-685.
9. Benakanakere M., Kinane D.F. Innate cellular responses to the periodontal biofilm. Frontiers of Oral. Biology. 2012, 1: 41-55.
10. Brunetti G., Colucci S., Pignataro P. et al. T cells support osteoclastogenesis in an *in vitro* model derived from human periodontitis patients. J. Periodontology. 2005, 10: 1675-1680.
11. Crotti T., Smith M.D., Hirsch R. et al. Receptor activator NFκB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. J. Periodontal Research. 2003, 4: 380-387.
12. Dewhirst F.E., Chen T., Izard J. et al. The human oral microbiome. J. Bacteriol. 2010, 192: 5002-5017.
13. Dunsche A., Açıllı Y., Dommisch H. et al. The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues. Eur. J. Oral. Sci. 2002, 110: 121-124.
14. Elson G., Dunn-Slegrist I., Daubeuf B. et al. Contribution of Toll-like receptors to the innate immune response to Gram-positive and Gram-negative bacteria. Blood. 2007, 109: 1574-1583.
15. Ekhlassi S., Scruggs L.Y., Garza T. et al. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide induces tumor necrosis factor- and interleukin-6 secretion, and CCL25 gene expression, in mouse primary gingival cell lines: interleukin-6-driven activation of CCL2. J. Periodontal Research. 2008, 4: 431-439.
16. Garlet G.P., Martins Jr. W., Fonseca B.A. et al. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. J. Clinical Periodontology. 2004, 8: 671-679.

17. Gemmell E., Seymour G.J. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontol.* 2000. 2004, 35: 21-41.
18. Graves D.T., Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J. Periodontology.* 2003, 3: 391-401.
19. Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J. Periodontology.* 2008, 8: 1585-1591.
20. Hans M., Hans V.M. Toll-like receptors and their dual role in periodontitis: a review. *J. Oral Science.* 2011, 53 (3): 263-271.
21. Hansson G.K., Edfeldt K. Toll to be paid at the gateway to the vessel wall. *Arteriosclerosis, Thrombosis, Vascular Biology.* 2005, 6: 1085-1087.
22. Hauber H.P., Tulic M.K., Tscicopoulos A. Toll-like receptors 4 and 2 expression in the bronchial mucosa of patients with cystic fibrosis. *Can. Respir. J.* 2005, 12: 13-18.
23. Hayashi F., Means T.K., Luster A.D. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood.* 2003, 7: 2660-2669.
24. Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T. et al. Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* 2000, 408 (6813): 740-745.
25. Honda T., Domon H., Okui T. et al. Balance of inflammatory response instable gingivitis and progressive periodontitis lesions. *Clin. Exp. Immunol.* 2006, 144 (1): 35-40.
26. Junemann S., Prior K., Szczepanowski R. et al. Bacterial community shift in treated periodontitis patients revealed by ion torrent 16S rRNA gene amplicon sequencing. *PLoS One.* 2012, 7 (8): e41606.
27. Jung I.H., Lee D.E., Yun J.H. et al. Anti-inflammatory effect of (-)epigallocatechin-3-gallate on *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-stimulated fibroblasts and stem cells derived from human periodontal ligament. *J. Periodontal Implant Science.* 2012, 6: 185-195.
28. Kim M., Jun H.K., Choi B.K. et al. Td92, an outer membrane protein of *Treponema denticola*, induces osteoclastogenesis via prostaglandin-E2-mediated RANKL/osteoprotegerin regulation. *J. Periodontal Research.* 2010, 6: 772-779.
29. Lerner U.H. Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis. *J. Dental Research.* 2006, 7: 596-607.
30. Liang S., Domon H., Hosur K.B. et al. Age-related alterations in innate immune receptor expression and ability of macrophages to respond to pathogen challenge in vitro. *Mech. Ageing. Dev.* 2009, 130: 538-546.
31. Lu H.K., Chen Y.L., Chang H.C. et al. Identification of the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand system in gingival crevicular fluid and tissue of patients with chronic periodontitis. *J. Periodontal Research.* 2006, 41: 354-360.
32. Marcopoulou C.E., Vavouraki H.N., Dereka X.E. et al. Proliferative effect of growth factors TGF-beta1, PDGF-BB and rhBMP-2 on human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. *J. Int. Acad. Periodontol.* 2003, 5 (3): 63-70.
33. Matsumoto C., Oda T., Yokoyama S. et al. Toll-like receptor 2 heterodimers, TLR2/6 and TLR2/1 induce prostaglandin E production by osteoblasts, osteoclast formation and inflammatory periodontitis. *Biochem. Biophys. Res. Communications.* 2012, 1: 110-115.
34. Morandini A.C., Sipert C.R., Gasparoto T.H. et al. Differential production of macrophage inflammatory protein-1, stromal-derived factor-1, and IL-6 by human cultured periodontal ligament and gingival fibroblasts challenged with lipopolysaccharide from *P. gingivalis*. *J. Periodontology.* 2010, 2: 310-317.
35. Nanbara H., Wara-Aswapati N., Nagasawa T. et al. Modulation of Wnt5a expression by periodontopathic bacteria. *PLoS One.* 2012, 4: ID e34434.
36. Nițulescu E.A., Crăițoiu M.M., Baniță M.I. et al. The involvement of TGF-β1 and CTGF in regional gingival overgrowth. *Rom. J. Morphol. Embryol.* 2012, 53 (1): 143-150.
37. Page R.C., Offenbacher S., Schroeder H.E. et al. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol.* 2000. 1997, 14: 216-248.
38. Park Y.D., Kim Y.S., Jung Y.M. et al. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide regulates interleukin (IL)-17 and IL-23 expression via SIRT1 modulation in human periodontal ligament cells. *Cytokine.* 2012, 1: 284-293.
39. Rakoff-Nahoum S., Paglino J., Eslami-Varzaneh F. et al. Recognition of commensal microflora by Toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell.* 2004, 118: 229-241.
40. Ren L., Jiang Z.Q., Fu Y. et al. The interplay of lipo-polysaccharide-binding protein and cytokines in periodontal health and disease. *J. Clin. Periodontol.* 2009, 36: 619-626.

41. Ritchlin C.T., Haas-Smith S.A., Li P. et al. Mechanisms of TNF- and RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in psoriatic arthritis. *J. Clinical Investigation*. 2003, 6: 821-831.
42. Scheres N., Laine M.L., de Vries T.J. et al. Gingival and periodontal ligament fibroblasts differ in their inflammatory response to viable *Porphyromonas gingivalis*. *J. Periodontal Research*. 2010, 2: 262-270.
43. Tang Y., Sun F., Li X. et al. *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharides induce RANKL by mouse osteoblast in a way different from that of *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *J. Endodontics*. 2011, 12: 1653-1658.
44. Tew J.G., El Shikh M.E., El Sayed R.M. et al. Dendritic cells, antibodies reactive with oxLDL, and inflammation. *J. Dental Research*. 2012, 1: 8-16.
45. Trevani A.S., Chorny A., Salamone G. et al. Bacterial DNA activates human neutrophils by a CpG-independent pathway. *Eur. J. Immunology*. 2003, 11: 3164-3174.
46. Yarilina A., Xu K., Chen J. et al. TNF activates calcium-nuclear factor of activated T cells (NFAT) c1 signaling pathways in human macrophages. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2011, 4: 1573-1578.
47. Yoshihiro A., Mastro S., Michiko N. et al. Role of b-defensins in oral epithelial health and disease. *Med. Mol. Morphol.* 2007, 40: 179-184.
48. Zadeh H.H., Kreutzer D.L. Evidence for involvement of superantigens in human periodontal diseases: skewed expression of T cell receptor variable regions by gingival T cells. *Oral Microbiological Immunology*. 1996, 11 (2): 88-95.
49. Zhang W., Swearingen E.B., Rigney J. et al. *Porphyromonas gingivalis* invades osteoblasts and inhibits bone formation. *Microb. Infection*. 2010, 11: 838-845.
50. Zhang W., Rigney T., Tribble G. Integrin alpha5 beta1- fimbriae binding and actin rearrangement are essential for *Porphyromonas gingivalis* invasion of osteoblasts and subsequent activation of the JNK pathway. *BMC Microbiology*. 2013, 1: 13-15.

Поступила 10.05.15

Контактная информация: Свитич Оксана Анатольевна,
105064, Москва, М. Казенный пер., 5а, р.т. (495)674-55-01

© И.Б.СЕМЕНОВА, 2016

И.Б.Семенова

РОЛЬ ПУРИНЭРГИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ В ИММУННОМ ОТВЕТЕ

НИИ вакцин и сывороток им.И.И.Мечникова, Москва

Пуриновые рецепторы располагаются на иммунных и соматических клетках организма животных и человека. Суммация сигналов с пуриновых и TOLL-подобных рецепторов происходит на уровне формирования инфламасомы и приводит к суммации первого и второго сигналов врожденного иммунитета. Первый сигнал — с PAMPs (pathogen associated molecular patterns), второй — с DAMPs (danger associated molecular patterns). Аденозинтрифосфат (АТФ) является наиболее изученным DAMP. АТФ соединяется с пуриновыми рецепторами, к которым относятся P2 (лучше всего описаны P2X7 рецепторы), что приводит к открытию каналов этих рецепторов и прохождению АТФ внутрь клетки. Параллельно наблюдают выход K^+ из клетки и вход Ca^{2+} и Na^+ в клетку, что ассоциируется с активацией иммунокомпетентной клетки. Источником экстраклеточного АТФ служат погибающие путем некроза или апоптоза поврежденные клетки, а также активированные иммунные клетки. В эффекторах врожденного иммунитета суммируются сигналы с P2 и TOLL-подобных рецепторов, а активация P2 рецепторов в лимфоцитах вносит вклад в активацию клеток, опосредованную T-клеточным рецептором. Негативной стороной активации пуриновых рецепторов является стимулирующее влияние на пролиферацию и метастазирование опухолевых клеток. Практическим выходом знаний о функционировании пуриновых рецепторов для клинической иммунологии является применение агонистов и антагонистов пуриновых рецепторов, а также объяснение действия иммуномодуляторов с позиции запуска K^+/Na^+ -насоса, приводящего к длительной активации иммунокомпетентных клеток.

Ключевые слова: пуриnergические рецепторы, нуклеотиды, некроз, апоптоз, сигналы опасности, коррекция вторичных иммунодефицитов

I.B.Semenova

ROLE OF PURINERGIC RECEPTORS IN IMMUNE RESPONSE

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Purine receptors are located on immune and somatic cells of animal and human organisms. Summation of signals from purine and TOLL-like receptors takes place on the level of inflammation formation and results in summation of the first and second signals of innate immunity. The first signal — from PAMPs (pathogen associated molecular patterns), the second — from DAMPs (danger associated molecular patterns). Adenosine triphosphate (ATP) is the most studied DAMP. ATP connects with purine receptors, which include P2 (P2X7 receptors are the best described), that results in opening of channels of these receptors and transit of ATP into the cell. In parallel exit of K^+ from cells and entrance of Ca^{2+} and Na^+ into the cells is observed, that is associated with activation of the immune competent cell. Damaged cells dying via necrosis or apoptosis are the source of extracellular ATP, as well as activated immunocytes. Signals from P2 and TOLL-like receptors are summarized in effectors of immune response, and activation of P2 receptors in lymphocytes makes a contribution into activation of cells, mediated by T-cell receptor. Negative side of purine receptor activation is a stimulating effect on proliferation and metastasis of malignant cells. The practical output of knowledge on functioning of purine receptors for clinical immunology is the application of agonists and antagonists of purine receptors, as well as explanation of effect of immune modulators from the position of launch of K^+/Na^+ -pump, resulting in prolonged activation of immune competent cells.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 2, P. 107—119

Key words: purinergic receptors, nucleotides, necrosis, apoptosis, danger signals, secondary immune deficiency correction

Пуриnergические рецепторы экспрессируются на клетках организма, включая иммунокомпетентные клетки, и осуществляют связывание с нуклеотидами и нуклеозидами. Нуклеотиды образуются при гибели поврежденных клеток путем апоптоза, некроза или при выполнении клетками организма их функций (например, активация и цитотоксическая функция Т-лимфоцитов).

В 2010 году Н.Б.Серебряной опубликован обзор преимущественно англоязычной литературы, в котором приводятся данные о роли нуклеотидов в регуляции иммунного ответа [3]. Автор подробно разбирает функции различных иммунокомпетентных клеток, развивающихся после соединения пуриnergических рецепторов с нуклеотидами, описывая особенности активации разных иммунных клеток (моноциты/ макрофаги, дендритные клетки, гранулоциты, естественные киллеры, Т- и В-лимфоциты), приводит данные о иммуномодулирующем действии нуклеотидов на иммунные клетки. Проанализированные в обзоре статьи позволяют сделать несколько основных выводов. Активация пуриnergических рецепторов приводит либо к запуску специфических функций клеток иммунной системы (хемотаксису клеток иммунной системы, выполнению их иммунной функции и апоптозу), либо к супрессии их функции. Направленность этих событий зависит в основном от дозы лигандов этих рецепторов, которыми являются нуклеотиды. Высокие концентрации последних, как правило, стимулируют иммунный ответ хозяина, а низкие подавляют. Кроме того, следует отметить, что механизмы функционирования разных популяций иммунных клеток при запуске сигналов с пуриnergических рецепторов имеют свои особенности.

В этом сообщении мы акцентируем внимание на двух сигналах активации врожденного иммунитета (ВИ): первый сигнал с PRRs (pattern recognition receptors, образраспознаю-

щие рецепторы) и второй — с пуринергических рецепторов (прежде всего после соединения с лигандом АТФ); на роли пуринергических рецепторов в инициации адаптивного иммунитета и активации иммунной системы в целом, на роли этих рецепторов в затухании иммунного ответа, механизмах проведения сигнала с пуриновых рецепторов, перспективе применения в практической медицине знаний об этих рецепторах, а также на основных результатах, опубликованных за последние 4 года по данной теме. Данные о функционировании пуринергических рецепторов позволили нам сделать предположение о механизме действия иммуностимулирующих лекарственных средств и о совершенствовании диагностики иммунодефицитных состояний и подходов в назначении повторных курсов иммуномодуляторов.

Несмотря на то, что пуринергические рецепторы располагаются практически на всех клетках организма человека и млекопитающих, наиболее подробно экспрессия и функция пуриновых рецепторов описана в работе с клетками иммунной системы и клетками глии [42, 48, 51]. Соединение пуринергических рецепторов с их лигандами приводит к инициации функций клеток. После активации этих рецепторов на иммунокомпетентных клетках на фоне активации рецепторов ВИ и адаптивного иммунитета формируется иммунный ответ [7].

Пуринергические рецепторы как лиганды DAMP. Для реализации ВИ сегодня считается необходимым запуск двух сигналов: первый — с TLRs, второй — с пуринергических рецепторов. Наиболее детально суммация этих двух сигналов изучена при секреторной функции макрофагов. Возможно, что и при фагоцитозе и представлении антигена требуются сигналы с P2-рецепторов и других рецепторов врожденного иммунитета. Клетки врожденного иммунитета распознают PAMPs — патоген-ассоциированные молекулярные образы, которые несут в своем составе микроорганизмы. Но для реализации иммунного ответа необходимы также DAMPs — сигналы опасности [30, 40]. DAMPs отсутствуют в экстраклеточном окружении здорового организма, в то же время, DAMPs быстро высвобождаются, прежде всего, после повреждения клеток и их гибели путем некроза или апоптоза. К наиболее хорошо изученным DAMPs относят, прежде всего, нуклеотиды — аденозинтрифосфат (АТФ), аденозиндифосфат (АДФ), аденозинмонофосфат (АМФ) и нуклеозид — аденозин. Клетки макроорганизма экспрессируют рецепторы для экстраклеточных нуклеотидов и нуклеозидов, которые называются пуринергическими рецепторами и делятся на два подтипа — P2 рецепторы (для АТФ, АДФ, АМФ) и аденозиновые рецепторы. Классификация этих рецепторов появилась уже в 1994 — 1998 годах [16, 41]. P2 рецепторы делятся также на три группы: ионотропные — P2X, метаболитные — P2Y и P2Z рецепторы. К P2X относятся следующие рецепторы: P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6, P2X7, к P2Y — P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13, P2Y14. P2X рецепторы представляют собой открытые для лигандов (чаще всего АТФ) ионные каналы, которые формируют третичные структуры. В группу аденозиновых рецепторов (AP) входят A1, A2A, A2B и A3 рецепторы. Аденозиновые рецепторы обозначают также как P1 рецепторы. Подробнее всего описаны P2X7 рецепторы. Разные нуклеотиды соединяются с разными или одним и тем же рецептором. Концентрация сигналов опасности (АТФ) в поврежденных тканях, например, подверженных воспалению, достаточна для активации P2 рецепторов.

Второй сигнал (с пуринергических рецепторов) приводит к открытию P2-каналов и проникновению АТФ внутрь клетки. После этого происходит выход K^+ из клетки и вход Ca^{2+} и Na^+ в клетку. Оба эти процесса участвуют в активации иммунокомпетентных клеток. В результате проведения сигнала с TLRs формируется про-формы ИЛ-1 β и ИЛ-18. Переход этих молекул в активные формы — ИЛ-1 β и ИЛ-18, в основном в макрофагах, опосредуется сигналом с P2 рецепторов. После соединения нуклеотидов с пуриновыми рецепторами наблюдают также презентацию антигена дендритными клетками (ДК) Т-лимфоцитам, дифференцировку CD4 $^+$ клеток в Th1, Th2, Th17, Treg, созревание цитотоксических лимфоцитов. Внутриклеточные механизмы перечисленных процессов наиболее полно описаны для перехода про-ИЛ-1 β и про-ИЛ-18 в активные формы [11].

Распознавание чужеродных микроорганизмов такими рецепторами ВИ, как TLRs, недостаточно для того, чтобы запустить иммунный ответ и воспаление. Для этого требуется

еще распознавание сигнала опасности. Распознавание АТФ, белка теплового шока и других сигналов опасности даже важнее, чем детекция чужеродного антигена, что было показано в экспериментах по асептическому воспалению [42].

Имеются данные, согласно которым стимуляция P2 рецептора с помощью АТФ не приводит к высвобождению некоторых изученных провоспалительных цитокинов эффекторами ВИ. Giquel T. et al. исследовали вовлечение пуриnergических рецепторов и NOD-подобных рецепторов в секрецию цитокинов макрофагами. Установлено, что в ответ на стимуляцию P2X7 и NLR-инфламасом с помощью АТФ происходит секреция ИЛ-1 β , но не ИЛ-1 α и ИЛ-6 [20]. Другими авторами также установлено, что стимуляция АТФ пуриnergических рецепторов вызывает секрецию не всех воспалительных медиаторов. Shieh C.H. et al. продемонстрировали, что антагонисты P2X7 рецепторов блокируют высвобождение ИЛ-6 и CCL2, но не индуцированное VzАТФ освобождение ФНО- α в клетках микроглии [48]. Авторы предположили, что P2X7-зависимая продукция цитокинов в микроглии реализуется различно. Bulanova E. et al. продемонстрировали способность АТФ соединяться с P2X1 и P2X3 рецепторами на тучных клетках и вызывать экспрессию ИЛ-4, ИЛ-6, ИФН- γ , ФНО- α , RANTES и MIP-2 на уровне mРНК [7]. Возможно, данный эффект связан с активацией разных пуриновых рецепторов или с другой модельной системой (тучные клетки, а не глия).

Роль пуриnergических рецепторов во врожденном и адаптивном иммунитете. Анализ данных об участии P2 рецепторов во врожденном и адаптивном иммунитете еще раз приводит к заключению о взаимосвязи и единстве этих двух механизмов иммунного ответа. P2 рецепторы относятся к новым рецепторам ВИ, хотя они принимают участие и в реализации функций приобретенного иммунитета [38, 53]. Нуклеотиды являются универсальными внеклеточными мессенджерами иммунного ответа [12]. Для нормальной функции иммунокомпетентных клеток (не только эффекторов ВИ, но и лимфоцитов) необходим приток Ca²⁺ внутрь клетки и выход АТФ во внеклеточное пространство, что, в свою очередь, стимулирует вход Ca²⁺ и выход АТФ. В иммунных клетках суммируются сигналы с «не своего» (TLRs, TCRs) и «поврежденного своего» (P2 рецепторы). В литературе более подробно описаны эти процессы для ВИ, хотя роль TCRs и P2 рецепторов для активации адаптивного иммунитета находится в процессе обсуждения. Активация иммунокомпетентных клеток под действием пуриновых рецепторов описана для ведущих популяций иммуноцитов: дендритных клеток, макрофагов, T- $\alpha\beta$, T- $\gamma\delta$ [3, 35, 42, 51]. P2 рецепторы на иммунокомпетентных клетках соединяются с нуклеотидами, присутствующими в экстраклеточном окружении. Это приводит к секреции макрофагами провоспалительных цитокинов, фагоцитозу, презентации антигена дендритными клетками, пролиферации T-лимфоцитов, хемотаксису, высвобождению цитокинов лимфоцитами и к цитотоксичности. У АТФ имеются качества, которые делают ее идеальным DAMP, возможно, много лучше, чем другие молекулы с аналогичной функцией. Прежде всего, направленный наружу трансмембранный градиент создает возможность быстро генерировать внеклеточный сигнал, который следует даже за небольшим повреждением клеток. Во-вторых, АТФ хорошо растворяется в воде экстраклеточного пространства благодаря своим зарядам. В-третьих, АТФ связывается с большим спектром рецепторов, что обеспечивает сигналинг с уникальной пластичностью. В-четвертых, сигнал от АТФ может быстро обрываться экто-АТФазами, таким образом, выполняя основные требования молекулы-«менеджера», т.е. быстрой инактивации, когда сигнал больше не нужен [42].

Долгое время не существовало подходящих методов для определения концентрации АТФ во внеклеточном пространстве [42]. Группой Rayah A. et al. был применен электрофорез для установления высвобождения АТФ или аденозина. В неповрежденных тканях содержание АТФ близко к нулю. В зоне воспаления или в микроокружении опухоли концентрация АТФ достигает сотен микромолей. ДК оригинально отвечают на градиент нуклеотидов. Только незрелые ДК способны к движению по направлению к большей концентрации нуклеотидов, в то время как зрелые ДК, несмотря на то, что они экспрессируют P2 рецепторы на том же уровне, что и незрелые ДК, полностью не способны к хемотаксису [28]. Это наводит на мысль о том, что после того, как ДК захватили антиген и мигрировали в лимфоузлы, они более не нуждаются в том, чтобы оставаться чувствительными к сигналу опасности. Зрелые ДК должны потерять нуклеотид-зависимую хе-

моатрагивную активность, чтобы мигрировать из богатых АТФ зон воспаления в лимфоузлы. Хорошо известно, что после захвата антигена в ДК начинается комплексный процесс дифференциации, который ведет к созреванию и формированию способности презентировать антиген лимфоцитам, что запускает иммунный ответ. ДК направляют CD4⁺ лимфоциты к дифференцировке в Th1, Th2, Th17, Treg, что зависит от типа и количества высвобождающихся цитокинов и экспрессии костимулирующих молекул. Такой процесс строго контролируется микроокружением в зоне воспаления и концентрацией АТФ. Показано также, что инкубация ДК в присутствии микромолярных концентраций АТФ запускает созревание ДК по направлению Th2-фенотипа, а аутокринное высвобождение АТФ модулирует дифференциацию Treg клеток [45].

Богатое АТФ микроокружение иммунных клеток воздействует на такие ключевые иммунные процессы как фагоцитоз, слияние фагосом и лизосом, высвобождение цитотоксических медиаторов. Достаточно давно было показано, что высокий уровень экстраклеточного АТФ ингибировал фагоцитоз мышинных макрофагов [50]. В другой работе [23] продемонстрирован эффект ингибиции поглощения частиц макрофагами человека при воздействии на них АТФ. Этот процесс оказался P2X7-зависимым. С другой стороны, УДФ (урединдифосфат), воздействуя на P2Y6 рецептор, является сильным агентом, воздействующим на фагоцитоз в микроглии [31]. Экстраклеточный АТФ обладает угнетающим воздействием на фагоцитоз, т.к. АТФ-опосредованная стимуляция P2X7 рецепторов является сильным индуктором слияния фагосом с лизосомами с последующей гибелью микроорганизмов [45]. Кроме переваривания микробов, содержащихся в лизосомах, АТФ вызывает высвобождение реактивных форм кислорода (ROS) из митохондрий и активацию NADPH-оксидазы в макрофагах. Противоречивые данные о модуляции фагоцитоза наводят на мысль о том, что при соединении с P2 рецепторами сначала этот процесс активируется, а потом наблюдают супрессию. Модулирующее воздействие (усиление, угнетение) АТФ на организм хозяина зависит от дозы нуклеотида и от стадии активации иммунных клеток. Возможно, с этим связана и описанная супрессия фагоцитоза.

АТФ является необходимым сигналом для активации Т-лимфоцитов и продукции ими ИЛ-2 после соединения TCR с антигеном. На уровне P2 рецепторов происходит связь ВИ и адаптивного иммунитета. Так, стимуляция TCR на Т-лимфоцитах способствует высвобождению АТФ, который стимулирует P2X7 рецепторы на клеточной поверхности, что приводит к входу Ca²⁺ в клетку, активации NFAT и синтезу ИЛ-2 [56]. Очень важно отметить, что продолжается накопление фактов, согласно которым P2X7 рецепторы участвуют в дифференцировке CD4⁺ лимфоцитов. Этот процесс носит множественный характер, и многое в нем остается неизученным. С одной стороны, P2X7 экспрессируются на Treg клетках, а с другой, стимуляция P2X7 ингибирует ответ Treg лимфоцитов и направляет их дифференцировку по Th17 пути [45]. Роль P2X7 показана также для дифференцировки макрофагов, когда этот рецептор модулирует слияние клеток и формирование гигантских клеток и гранулем. Цитотоксический эффект, зависимый от P2X7-активации, впервые был описан для мышинных лимфоцитов [13]. Считалось, что этот процесс осуществляет Т-клеточную цитотоксичность. Но данная гипотеза никогда не получала экспериментального подтверждения, и до настоящего времени остается неясным вопрос о физиологическом значении клеточной смерти, осуществляемой путем связывания P2X7 рецепторов АТФ. Следует отметить, что, несмотря на то, что P2X2 и P2X4 рецепторы вовлекаются в цитотоксический процесс, P2X7 экспрессия необходима для поддержания опосредованной АТФ цитотоксичности, что продемонстрировано на всех исследованных клеточных моделях [42].

Опыты, проведенные с опухолевыми клетками, привели к предположению, что связь ВИ и адаптивного иммунитета осуществляется на уровне NLRP3 инфламасом. Противораковая терапия была неэффективна против опухолей в организмах, в которых не экспрессировались P2X7, NLR3, Casp1 [19].

Регуляция формирования инфламасом различается в макрофагах и дендритных клетках. He Y. et al. установили, что ДК могут синтезировать зрелый ИЛ-1 β в ответ на стимуляцию их лигандами в отсутствие стимуляции АТФ [26].

Таким образом пуриnergические рецепторы играют неотъемлемую роль в активации как ВИ, так и приобретенного иммунитета. В случае ВИ внутри иммунокомпетентной

клетки происходит суммация сигналов с TLRs и P2 рецепторов. Для запуска адаптивного иммунитета также необходимы сигналы с пуриnergических рецепторов и активация TCR и BCR. Последнее положение требует дальнейшего изучения.

Пути высвобождения АТФ из клеток во внеклеточное пространство. Внутриклеточный АТФ переходит во внеклеточное пространство через паннексиновые и коннексиновые каналы. Есть данные, согласно которым высвобождение АТФ может осуществляться и через P2-каналы, а также через Ca^{2+} -каналы и даже через TLRs [42, 51]. Источником экстраклеточного АТФ являются не только погибающие путем некроза или апоптоза клетки при инфекции, воспалении или другом повреждении, а также нормально функционирующие клетки иммунной системы [21, 24]. В работе Ren H. et al. приводятся данные, согласно которым АТФ может высвобождаться через TLR-ассоциированный сигналинг у мышей, инфицированных *Escherichia coli*, и в макрофагах, обработанных ЛПС или Pam3CSK4. Авторы полагают, что главную роль в высвобождении АТФ играет экзоцитоз, т.к. этот процесс (высвобождение АТФ) полностью блокируется N-этилмалеимидом, но не карбенксолоном, флуфенамиковой кислотой или пробенесидом [43]. Функцию пуриновых рецепторов нельзя рассматривать без связи с паннексиновыми и коннексиновыми каналами [51]. Saez P.J. et al. подробно изучили экспрессию и функционирование этих каналов на антиген-представляющих клетках. Экспрессирующиеся на поверхности клетки P2 рецепторы могут вступать во взаимодействие с паннексиновыми каналами. Так, после активации P2X7 рецепторов с помощью экстраклеточного АТФ открываются паннексиновые каналы. АТФ может освобождаться из иммунокомпетентных клеток также через TLRs. Так, Ren H. et al. в 2014 году показали это в работе с мышами, зараженными *E.coli*, и с макрофагами, обработанными ЛПС и Pam3CSK4 [43].

Гипертонический стресс наряду с механическим стрессом может приводить к высвобождению АТФ из поврежденных клеток во внеклеточную среду [33].

Супрессия иммунного ответа посредством активации пуриnergических рецепторов. Нуклеотиды запускают иммунные реакции, а продукты их метаболизма останавливают этот процесс. После высвобождения АТФ во внеклеточное пространство происходит его деградация до АДФ, АМФ и аденозина. Катализаторами такого превращения являются эндонуклеазы CD39 и CD73 — ферменты, поддерживающие гомеостаз. Экспрессируются CD39 и CD73 на поверхности FoxP3+ Treg клеток [34, 47]. Аденозин, образующийся из АТФ путем воздействия на АТФ этими ферментами, осуществляет противовоспалительный эффект Treg. Romio M. et al. [44] показали, что аденозин, который образуется при реакции CD73-энзима с нуклеотидами, соединяется с A2A рецепторами и угнетает NFκB активацию в T-эффекторных лимфоцитах, что, в свою очередь, уменьшает продукцию провоспалительных цитокинов и хемокинов [44]. Активация A2A рецептора на Treg запускает экспансию этих клеток, тем самым осуществляя регуляцию иммунного ответа [14]. У человека 90% FoxP3+ клеток экспрессируют CD39, а экспрессия CD73 минимальная [34]. Qiu F. и Dahl G. продемонстрировали, что клетки, коэкспрессирующие паннексиновые каналы и P2Y или P2X7 рецепторы в присутствии высокого уровня АТФ, только временно активируют паннексиновые каналы. АТФ запускает отрицательную обратную связь и инактивирует паннексиновые каналы. Этот механизм осуществляет другой путь иммунорегуляции, угнетая иммунный ответ и защищая от повреждения ткани при продолжительном воспалении. Парадоксально, но было установлено, что как агонисты, так и антагонисты пуриновых рецепторов были ингибиторами паннексиновых каналов в данном исследовании [40].

Завершение иммунного ответа, по-видимому, может осуществляться и посредством апоптоза T-лимфоцитов. Shoji K.F. et al. установили связь между P2X7 рецепторами и паннексиновыми каналами. Экстраклеточный АТФ высвобождается через паннексиновые каналы и соединяется с P2X7 рецепторами, что приводит к смерти CD4 и CD8 клеток. [49].

Интересные и противоречивые данные получены отечественными специалистами, согласно которым стимуляция культуры моноцитов аденозином приводила к накоплению в надосадке про- и противовоспалительных цитокинов [2]. Учитывая, что на моноцитах имеются рецепторы в ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-1β, нельзя прогнозировать биологический эффект цитокинов вне культуры клеток.

Активация P2X7 рецептора не всегда приводит к усилению иммунного ответа. Иногда угнетение отдельных клеточных популяций вызывает стимуляцию функции иммунной системы в целом. Парadoxально, но факт, что иммуносупрессия может быть индуцирована через активацию классического провоспалительного рецептора P2X7. Этот феномен описан Morandini A.C. et al. [37]. Авторы показали, что мыши с дефицитом CD39 (эктоАДФ/-АТФазы) были защищены против ConA-индуцированного гепатонекроза, потому что были не способны к деградации АТФ. У этих животных наблюдали аккумуляцию нуклеотида до уровня, достаточного, чтобы запустить P2X7-зависимый апоптоз НКТ-клеток — главного эффектора ConA-индуцированного повреждения печени. Стимуляция высвобождения некоторых медиаторов иммунного ответа может приводить к супрессии иммунного ответа на уровне макроорганизма. АТФ может также угнетать иммунный ответ путем увеличения содержания тромбоспондина и индолеминовой 2, 3 диоксигеназы — факторов, ингибирующих клеточную пролиферацию и способствующих высвобождению TGF- β [37].

Активация пуриновых рецепторов приводит к стимуляции функции иммунной системы в целом. После соединения АТФ с P2X7 рецепторов на поверхности Treg клеток происходит ингибция функции этих клеток [45]. Schenk U. et al. показали, что синтез АТФ, который усиливался под действием провоспалительного цитокина ИЛ-6, и сигнал с P2X7 рецепторов в Treg запускали конверсию этих клеток в ИЛ-17 продуцирующие Th17. Применение антагонистов P2X7 рецепторов приводило к превращению CD4+ наивных T-клеток в Treg вследствие стимуляции T-клеточного рецептора [45].

Продукция цитокинов и модуляция их секреции и секреции хемокинов при соединении нуклеотидов с P2 рецепторами. Антагонисты P2X7 рецепторов предотвращают созревание и секрецию ИЛ-1 β и ИЛ-18, которые были вызваны разными стимулами. Блокада рецепторной активности не влияла на продукцию ИЛ-1 β моноцитами, несущими мутантную инфламасому, которая не требовала экзогенного АТФ для активации [39]. Другими авторами [9] установлено, что, напротив, блокада P2X7 рецепторов супрессирует индуцированное HNP-1 (пептидом нейтрофилов) освобождение зрелого ИЛ-1 β . В мутантных инфламасомах со сниженной активностью каспазы-1 освобождение ИЛ-1 β было незначительно повреждено. Секреция некоторых других цитокиновых молекул (например, для ИЛ-12) была ингибирована экстраклеточным АТФ [32]. Направленность этих эффектов зависела от дозы нуклеотида и от субтипа рецептора. В низких концентрациях АТФ обладал преимущественно иммуносупрессивной, толерогенной активностью, воздействуя при этом на P2Y1 и/или P2Y11 рецепторы. В высоких дозах эффект был в основном провоспалительным, что, весьма вероятно, обусловлено соединением АТФ с P2X7 рецепторами. Кроме того, низкие дозы АТФ преимущественно активировали иммуносупрессивные или толерогенные пути, в то время как высокие дозы запускали провоспалительные механизмы. АТФ обладал сильным модулирующим воздействием на хемокины, вызывая высвобождение CCL2 и угнетая ЛПС-индуцированную секрецию CXCL10 и CCL5. Эффект модуляции продукции цитокинов и хемокинов, с одной стороны, уменьшал дифференцировку Th1, а с другой — запускал Th2-дифференцировку.

Для другого цитокина, принимающего участие, прежде всего, в инициации ВИ, ИФН- β суммация сигналов с TLRs происходит на уровне промотера ИФН- β , т.е. не на молекулярном, как у ИЛ-1 β , а на генетическом уровне. Стимуляция агонистами этих рецепторов значительно усиливала ЛПС-индуцированную экспрессию ИФН- β в макрофагах. Усиление было супрессировано в макрофагах, которые не экспрессировали P2X7 рецептор или если МАРК MEK1/2 путь был ингибирован [17].

Gicquel T. et al. в результате работы с агонистами и антагонистами P2X7 рецепторами сделали предположение о том, что эти рецепторы не вовлекаются в продукцию ИЛ-1 α и ИЛ-6 в макрофагах моноцитарного происхождения, обработанных низкими концентрациями ЛПС [20].

В современной литературе имеются данные о регуляторном воздействии цитокинов на P2 рецепторы. Так, при иммуновоспалительном заболевании неизвестного происхождения, которое носит название болезни Бесета, увеличена экспрессия и усилена функция P2X7 рецепторов по сравнению с контрольной группой здоровых лиц. Авторы [8] связы-

вают этот факт с модулирующим действием ФНО- α на P2X7 рецептор, потому что анти-ФНО- α соединения эффективны для лечения этой болезни.

Nasko G. et al. описали не зависящую от ИЛ-10 модуляцию (супрессию) продукции цитокинов ИЛ-12 и ФНО- α при воздействии на макрофаги разных аналогов АТФ и ЛПС [25]. По данным других авторов [32] внеклеточный АТФ служит важным регулятором, который приводит к затуханию продукции ИЛ-12 дендритными клетками и предотвращает слишком сильный и повреждающий иммунный ответ.

Суммация сигналов с пуриновых и не пуриновых рецепторов ВИ. Проведенный нами анализ экспериментальных и теоретических статей, опубликованных за последнее десятилетие, не выявил прямого взаимодействия АТФ с TLRs, NodLikeRs, Rig-likeRs или взаимодействия PAMPs с пуриновыми рецепторами. Имеются данные о влиянии PAMPs (ЛПС и липотейхоевой кислоты) на активацию P2X7 рецепторов и модуляцию их функции с помощью этих структур [27]. Суммация сигналов PAMPs и DAMPs (прежде всего АТФ) происходит внутри иммунокомпетентной клетки хозяина и является каспаза-1 зависимым процессом. Это продемонстрировано как в опытах по активации врожденного иммунитета, так и при изучении клеточной смерти. Так, пирозитоз (каспаза-1 зависимая клеточная смерть), ассоциированный с провоспалительными цитокинами, индуцированный двумя сигналами, был ингибирован с помощью ингибитора каспаза-1. Это соединение ингибировало ЛПС- и АТФ-индуцированное освобождение ИЛ-1 β . Опыты проводили на клеточной линии мышинных макрофаг-подобных клеток J774. Секретия ИЛ-1 β на этой модели была стимулирована как ЛПС, так и АТФ. Взятые отдельно эти PAMP и DAMP не стимулировали выработку ИЛ-1 β . Ранее Ferrari D. et al. описали суммацию сигналов с TLRs и пуриновых рецепторов в дендритных клетках. Стимуляция клеток такими лигандами как ЛПС и АТФ приводит к высвобождению ИЛ-1 β и ФНО- α . Авторы рассматривают пуринорецепторы как новый путь модуляции функции дендритных клеток [15].

Стоит остановиться на результатах, полученных Gulinelli S. et al. Исследователи получили данные, согласно которым для формирования про-ИЛ-18 в макрофагах не требуется их предварительной обработки ЛПС, т.к. этот процитокин уже присутствует в непримированных макрофагах и его концентрация не уменьшается при инкубации с ЛПС-связывающим антибиотиком полимиксином В или с ингибитором TLR-4 — CLI-095. После соединения P2X-рецепторов на поверхности макрофагов происходит образование микровезикул, содержащих ИЛ-18, которые сливаются с поверхности этих иммунокомпетентных клеток [24].

Таким образом, соединение пуриnergических рецепторов с их лигандами приводит к секреции цитокинов (прежде всего ИЛ-1 β и ИЛ-18), а также разнонаправленно влияет на продукцию некоторых других цитокиновых и хемокиновых молекул. На наш взгляд, модулирующий эффект АТФ реализуется на уровне продукции цитокинов и хемокинов.

Механизмы действия пуриnergических рецепторов. Описаны механизмы функционирования пуриновых рецепторов. Так, известно, что внеклеточный АТФ обладает способностью формировать поры в клеточной мембране после соединения с P2X7 комплексом и вызывать проникновение нуклеотида в клетки. Два немышечных миозина, ассоциированных с P2X7 рецептором — NMMHC-IIA и миозин Va, были обнаружены на TNP-1 и HEK-299 клетках соответственно [22]. Активация этих рецепторов с помощью АТФ вызывает диссоциацию P2X7 с немышечного миозина в обеих клеточных линиях. Описанная диссоциация может требоваться для преобразования P2X7 канала в поры. Анализируя функционирование P2 рецепторов, можно сделать предположение о том, что эти структуры действуют и как каналы, и как рецепторы. Соединение A438079 — антагонист P2X7 рецептора усиливает АТФ-индуцированное высвобождение ФНО- α , а антагонист канала — SKF96365 — ингибирует этот процесс [29].

В ходе анализа вышеописанных процессов возникает вопрос: почему для формирования инфламасомы необходимо прохождение АТФ через P2 рецепторы, а накопленный внутри клетки АТФ не стимулирует этот процесс? Нами сделано предположение о том, что кроме входа внутрь клетки, этот нуклеотид взаимодействует с P2 рецепторами и проводит сигнал с P2 рецепторов каким-то еще не установленным образом. Таким образом, P2 рецепторы, по-видимому, функционируют и как каналы, и как классические рецепторы. Высказанное нами предположение подтверждается успешным применением агонистов P2 рецепторов,

так как если бы эти рецепторы только бы осуществляли проникновение АТФ внутрь клетки, агонисты, отличные от АТФ, не передавали бы сигнал с таким же эффектом, и нуклеотиды. Опубликована статья [Stolz M. et al., 2015], в которой приводятся данные о потоках K^+ из клетки и Na^+ и Ca^{2+} в клетку через P2X7 рецепторы после их активации экстраклеточным АТФ. В связи с этим, активацию иммунокомпетентных клеток после соединения АТФ с P2X7 рецепторами можно предположительно объяснить также и воздействием на клетку этих катионов. Хотя физиологическая роль повышения внутриклеточного Ca^{2+} общепризнана, биофизику кальциевого потока трудно объяснить в основном из-за того, что традиционные методы измерения Ca^{2+} проницаемости сложно применить к функционированию P2X7 рецепторов [Liang X. et al., 2015].

Функционирование пуриnergических рецепторов находится под генетическим контролем. Гены P2X7 рецептора имеют много полиморфных вариантов и изоформ, что усиливает или ослабляет функцию этих рецепторов [53].

Взаимодействие сигналов соматических и иммунных клеток в свете воздействия АТФ на пуриnergические рецепторы. Появляются работы, в которых описано взаимодействие сигналов соматических и иммунокомпетентных клеток и их совместная роль в иммунных процессах и защите организма от различных инфекций. Yao Y. et al. была описана способность интерстициальных эпителиальных клеток мыши вызывать формирование резидентных толерогенных дендритных клеток и ИФН- β (+) и ИЛ-17 (+) Т-клеток памяти под влиянием сигнала с АТФ, который модулировал хемокиновый ответ на TLR5-лигандассоциированный ответ и развитие колита в присутствии флагелина. В этой работе было сделано предположение о том, что супернатанты из интерстициальных эпителиальных клеток, стимулированные флагелином +АТФ, стимулировали экспрессию CD80 на дендритных клетках костномозгового происхождения и продукцию ими цитокинов, характерную для Th1/Th17-поляризации [55].

Практическое значение использования знаний о функционировании пуриnergических рецепторов. Описанные закономерности действия сигналов при активации P2 рецепторов открывает четыре прикладных направления в практической медицине. Во-первых, использование агонистов P2 рецепторов; во-вторых — антагонистов, в-третьих, совершенствование использования иммуотропных лекарственных средств, а также применение нуклеотидов в качестве иммунорегуляторов.

Использование агонистов пуриnergических рецепторов рассматривают, прежде всего, в качестве адъювантов для существующих или создающихся вакцин, а антагонистов — как противовоспалительных средств в комплексной терапии опухолей и в дальнейшем, возможно, и при лечении аллергических и аутоиммунных заболеваний [5, 12, 21, 25, 36]. Так, поводом для использования агонистов P2 рецепторов в качестве адъюванта послужил ряд исследований, включая такие, как определение повышенной экспрессии следующих маркеров: I-A, CD80, CD86 и ИЛ-1 β и ИЛ-12p40 при угнетении экспрессии ИЛ-10 на антигенпредставляющих клетках (клетки Лангерганса) [21].

Нарушение проведения сигнала с P2X7 рецепторов на разных уровнях может оказаться перспективным направлением для лечения аллергического контактного дерматита, т.к. сенсибилизация к контактными аллергенами требует активации ВИ эндогенными сигналами опасности [52].

Наиболее подробно роль пуриновых рецепторов и паннекссиновых каналов на уровне целого организма описана при воспалении, ишемическом инсульте, атеросклерозе, ВИЧ-инфекции, аутоиммунных заболеваниях [42, 51]

Среди всех эффектов, развивающихся при активации P2 рецепторов, больше всего выражено провоспалительное действие. Осуществляют это действие, прежде всего, P2Y2 и P2X7 рецепторы. P2Y2 отвечают за привлечение нейтрофилов, дендритных клеток, эозинофилов и макрофагов в области воспаления и могут также участвовать в освобождении провоспалительных факторов, таких как ИЛ-33 или MCP-1 /CCL2. Среди P2 рецепторов привлекают особое внимание P2X7, т.к. их участие в воспалении является наиболее выраженным и хорошо изученным. P2X7 отличаются от других P2X рецепторов своими C-окончаниями, которые примерно на 200 аминокислот длиннее, чем у других P2X структур. Кратковременная активация P2X7 рецепторов экстраклеточным АТФ в его тетраанионной форме — АТФ4 — открывает катион-специфические ионные каналы. Длительное

связывание P2X7 запускает формирование неселективных пор, через которые могут проходить молекулы до 900 Да. В зависимости от типа клеток P2X7-стимуляция запускает открытие неселективных пор, которые осуществляют захват катионов и анионов. Формирование неселективных пор зависит от цитоплазмического С-концевого домена P2X7 рецепторов. Длительная активация P2X7 приводит к свертыванию мембраны и клеточной смерти путем лизиса/некроза или апоптоза в зависимости от типа клеток [10].

Связывание пуриnergических рецепторов с их антагонистами считается перспективным направлением противовоспалительной терапии. При этом не происходит преобразования про-ИЛ-1 β в ИЛ-1 β и про-ИЛ-18 в ИЛ-18. Таким образом, на фоне соединения TLRs с лигандами микроорганизмов не развивается воспалительный процесс [51]. Другими авторами подтверждено, что знания о проведении сигналов с пуриновых рецепторов могут послужить новыми терапевтическими возможностями для лечения воспалительных заболеваний [6].

Выявлено и негативное воздействие АТФ на организм. Xie R. et al. установили, что активация P2Y2 рецептора в клетках человеческой гепатокарциномы запускает пролиферацию и миграцию этих клеток [54]. Авторы обсуждают использование антагонистов P2Y2 рецептора у больных. Другим коллективом исследователей [18] показана возможность применения ингибитора P2Y12 рецептора для угнетения адгезии опухолевых клеток и метастазирования меланомы V16-F10.

Зиганшин А.У и др. в своем обзоре приводят данные о терапевтическом действии раствора АТФ у больных раком легких. Внутривенное введение такого раствора уменьшает потерю массы тела, нормализует сниженные концентрации альбумина крови, снижает смертность и повышает качество жизни больных [1]. Механизмом лечебного действия является апоптоз клеток опухоли, развивающийся после открытия неселективных пор в мембранах клеток. В этом же обзоре обсуждается действие АДФ в качестве агониста, а АТФ — как антагониста P2Y12 рецептора. Возможно, и на P2Y2 АТФ воздействует как антагонист.

В работе, посвященной протективному действию препарата ферровир при остром экспериментальном аллергическом энцефаломиелите (модель рассеянного склероза на крысах и мышах), Серебряная Н.Б. и др. [4] показали эффективность этого препарата и обсуждают возможность иммуномодулирующего действия нуклеотидов, входящих в его состав. Авторы предполагают, что молекулы ДНК в составе ферровира способны проникать внутрь клетки макроорганизма и метаболизироваться до нуклеозидов (прежде всего АТФ и АДФ.) Выходя из клеток во внеклеточное пространство нуклеотиды связываются с пуриновыми рецепторами на клетках иммунной и нервной систем и модулируют иммунный ответ. Модуляция, по мнению авторов, приводит к высвобождению противовоспалительного цитокина ИЛ-10 и ингибции продукции провоспалительных цитокинов, а также к угнетению синтеза цитокинов Th1 (ИЛ-2, ФНО-, ИФН-), Th2 (ИЛ-4, ИЛ-5) и хемокина MCP-1.

При нормальной функции иммунокомпетентных клеток происходит выход АТФ из клетки во внеклеточную среду и соединение его с P2 рецепторами, что, в свою очередь, запускает выход K⁺ из клетки и вход Ca²⁺ и Na⁺ внутрь клетки. Наблюдаемые после активации P2 рецепторов проникновение Ca²⁺ и Na⁺ внутрь клетки и выход K⁺ из клетки позволили нам сделать предположение, согласно которому многократное применение иммунотропных препаратов (а эти лекарственные средства вводятся многократно курсами) запускает K⁺/Na⁺ насос, что обеспечивает длительную активацию иммунцитов и стабильную ремиссию иммунодефицитных состояний после курса иммуномодулятора. После затухания функционирования K⁺/Na⁺ насоса, по-видимому, происходит угнетение иммунного ответа и наступает рецидив иммунодефицита. Определение активного состояния K⁺/Na⁺ насоса, вероятно, позволит осуществлять лабораторную диагностику начала формирования обострения синдрома вторичного иммунодефицита и осуществлять назначение иммуномодуляторов до клинического проявления рецидива иммунологической недостаточности.

В заключении изложенного материала следует отметить, что знания о функционировании пуриnergических рецепторов вносят вклад в теоретическую иммунологию, а также имеют прикладное значение.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зиганшин А.У., Зиганшина Л.Е., Бернсток Дж. P-2 рецепторы: теоретические предпосылки клинического воздействия. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2002, 134 (10): 365-370.
2. Невская К.В., Огородова Л.М., Юрьева К.С., Иванюк Е.Э., Иккерт О.П., Салтыкова И.В., Сазонов А.Э. Особенности цитокинового профиля моноцитов при стимуляции аденозиновых рецепторов *in vitro*. Цитокины и воспаление. 2014, 13 (1): 67-70.
3. Серебряная Н.Б. Нуклеотиды как регуляторы иммунного ответа. Иммунология. 2010, 5: 273-281.
4. Серебряная Н.Б., Карпенко М.Н., Житнухин Ю.Л., Бисага Г.Н., Абдурасулова И.Н. Исследование протективного действия препарата ферровир при остром экспериментальном аллергическом энцефаломиелите. Цитокины и воспаление. 2010, 9 (1): 33-38.
5. Bartlett R., Stokes L., Sluyter R. The P2X7 receptor channel: recent developments and the use of P2X7 antagonists in models of disease. *Pharmacol Rev.* 2014. Jul; 66 (3): 638-675.
6. Bours M.J., Dagnelie P.C., Giuliani A.L. et al. P2 receptors and extracellular ATP: a novel homeostatic pathway in inflammation. *Front Biosci.* 2011, Jun; 1 (3): 1443-1456.
7. Bulanova E., Budagian V., Orinska Z. et al. Bulfone-Paus SATP induces P2X7 receptor-independent cytokine expression through P2X1 and P2X3 receptors in murine mast cells. *J. Leukoc. Biol.* 2009, Apr; 85 (4): 692-702.
8. Castrichini M., Lazzarini P.E., Gamberucci A. et al. The purinergic P2x7 receptor is expressed on monocytes in Behçet's disease and is modulated by TNF- α . *Eur. J. Immunol.* 2014, Jan; 44 (1): 227-238.
9. Chen Q., Jin Y., Zhang K. et al. Alarmin HNP-1 promotes pyroptosis and IL-1 β release through different roles of NLRP3 inflammasome via P2X7 in LPS-primed macrophages. *Innate Immun.* 2014, Apr; 20 (3): 290-300.
10. Cisneros-Mejorado A., Pérez-Samartín A., Gottlieb M., Matute C. ATP signaling in brain: release, excitotoxicity and potential therapeutic targets. *Cell Mol. Neurobiol.* 2015, Jan; 35 (1): 1-6.
11. Coutinho-Silva R., Corrêa G., Sater A.A., Ojcius D.M. The P2X(7) receptor and intracellular pathogens: a continuing struggle. *Purinergic Signal.* 2009, Jun; 5 (2): 197-204.
12. Di Virgilio F., Boeynaems J.M., Robson S.C. Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2009, Aug; 9 (4): 507-513.
13. Di Virgilio F., Bronte V., Collavo D., Zanovello P. Responses of mouse lymphocytes to extracellular adenosine 5'-triphosphate (ATP). Lymphocytes with cytotoxic activity are resistant to the permeabilizing effects of ATP. *J. Immunol.* 1989, Sep; 143 (6): 1955-1960.
14. Dwyer K.M., Hanidziar D., Putheti P. et al. Expression of CD39 by human peripheral blood CD4+CD25+ T cells denotes a regulatory memory phenotype. *Am. J. Transplant.* 2010, Nov; 10 (11): 2410-2420.
15. Ferrari D., La Sala A., Chiozzi P. et al. The P2 purinergic receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release. *FASEB J.* 2000, Dec; 14 (15): 2466-2476.
16. Fredholm B.B., Abbracchio M.P., Burnstock G. et al. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol. Rev.* 1994, Jun; 46 (2): 143-156.
17. Gavala M.L., Liu Y.P., Lenertz L.Y. et al. Nucleotide receptor P2RX7 stimulation enhances LPS-induced interferon- β production in murine macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 2013, Oct; 94 (4): 759-768.
18. Gebremeskel S., LeVatte T., Liwski R.S. et al. The reversible P2Y12 inhibitor ticagrelor inhibits metastasis and improves survival in mouse models of cancer. *Int. J. Cancer.* 2015, Jan; 136 (1): 234-240.
19. Ghiringhelli F., Apetoh L., Tesniere A. et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 β -dependent adaptive immunity against tumors. *Nat. Med.* 2009, Oct; 15 (10): 1170-1178.
20. Gicquel T., Victoni T., Fautrel A. et al. Involvement of purinergic receptors and NOD-like receptor-family protein 3-inflammasome pathway in the adenosine triphosphate-induced cytokine release from macrophages. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2014, Apr; 41 (4): 279-286.
21. Granstein R.D., Ding W., Huang J. et al. Augmentation of cutaneous immune responses by ATP gamma S: purinergic agonists define a novel class of immunologic adjuvants. *J. Immunol.* 2005, Jun 15; 174 (12): 7725-7731.
22. Gu B.J., Rathsam C., Stokes L. et al. Extracellular ATP dissociates nonmuscle myosin from P2X(7) complex: this dissociation regulates P2X (7) pore formation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2009, Aug; 297 (2): 430-439.

23. Gu B.J., Saunders B.M., Jursik C., Wiley J.S. The P2X7-nonmuscle myosin membrane complex regulates phagocytosis of nonopsonized particles and bacteria by a pathway attenuated by extracellular ATP. *Blood*. 2010, Feb 25; 115 (8): 1621-1631.
24. Gulinelli S., Salaro E., Vuerich M. et al. IL-18 associates to microvesicles shed from human macrophages by a LPS/TLR-4 independent mechanism in response to P2X receptor stimulation. *Eur. J. Immunol.* 2012, Dec; 42 (12): 3334-3345.
25. Haskó G., Kuhel D.G., Salzman A.L., Szabó C. ATP suppression of interleukin-12 and tumour necrosis factor- α release from macrophages. *Br. J. Pharmacol.* 2000, Mar; 129 (5): 909-914.
26. He Y., Franchi L., Núñez G. TLR agonists stimulate Nlrp3-dependent IL-1 β production independently of the purinergic P2X7 receptor in dendritic cells and in vivo. *J. Immunol.* 2013, Jan 1; 190 (1): 334-339.
27. Hu Z., Murakami T., Suzuki K. et al. Antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 inhibits the LPS/ATP-induced pyroptosis of macrophages by dual mechanism. *PLoS One*. 2014, Jan 16; 9 (1): e85765.
28. Idzko M., Dichmann S., Ferrari D. et al. Norgauer J. Nucleotides induce chemotaxis and actin polymerization in immature but not mature human dendritic cells via activation of pertussis toxin-sensitive P2y receptors. *Blood*. 2002, Aug 1; 100 (3): 925-932.
29. Ikeda M., Tsuno S., Sugiyama T. et al. Ca(2+) spiking activity caused by the activation of store-operated Ca(2+) channels mediates TNF- α release from microglial cells under chronic purinergic stimulation. *Biochim. Biophys. Acta*. 2013, Dec; 1833 (12): 2573-2585.
30. Janeway C.A., Jr. How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect.* 2001, Nov; 3 (13): 1167-1171.
31. Koizumi S., Shigemoto-Mogami Y., Nasu-Tada K. et al. UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature*. 2007, Apr 26; 446 (7139): 1091-1095.
32. la Sala A., Ferrari D., Corinti S. et al. Extracellular ATP induces a distorted maturation of dendritic cells and inhibits their capacity to initiate Th1 responses. *J. Immunol.* 2001, Feb 1; 166 (3): 1611-1617.
33. Loomis W.H., Namiki S., Ostrom R.S. et al. Hypertonic stress increases T cell interleukin-2 expression through a mechanism that involves ATP release, P2 receptor, and p38 MAPK activation. *J. Biol. Chem.* 2003, Feb 14; 278 (7): 4590-4596.
34. Mandapathil M., Lang S., Gorelik E., Whiteside T.L. Isolation of functional human regulatory T cells (Treg) from the peripheral blood based on the CD39 expression *J. Immunol. Methods*. 2009, Jul 31; 346 (1-2): 55-63.
35. Manohar M., Hirsh M.I., Chen Y. et al. ATP release and autocrine signaling through P2X4 receptors regulate $\gamma\delta$ T cell activation. *J. Leukoc. Biol.* 2012, Oct; 92 (4): 787-794.
36. Michel A.D., Ng S.W., Roman S. et al. Mechanism of action of species-selective P2X(7) receptor antagonists. *Br. J. Pharmacol.* 2009, Apr; 156 (8): 1312-1325.
37. Morandini A.C., Savio L.E., Coutinho-Silva R. The role of P2X7 receptor in infectious inflammatory diseases and the influence of ectonucleotidases. *Biomed J.* 2014, Aug; 37 (4): 169-177.
38. Ousingawat J., Wanitchakool P., Kmit A. et al. Anoctamin 6 mediates effects essential for innate immunity downstream of P2X7 receptors in macrophages. *Nat. Commun.* 2015, Feb 5; 6: 6245.
39. Piccini A., Carta S., Tassi S. et al. ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1 β and IL-18 secretion in an autocrine way. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008, Jun 10; 105 (23): 8067-8072.
40. Qiu F., Dahl G. A permeant regulating its permeation pore: inhibition of pannexin 1 channels by ATP. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2009, Feb; 296 (2): 250-255.
41. Ralevic V., Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 1998, Sep; 50 (3): 413-492.
42. Rayah A., Kanellopoulos J.M., Di Virgilio F. P2 receptors and immunity. *Microbes Infect.* 2012, Nov; 14 (14): 1254-1262.
43. Ren H., Teng Y., Tan B. et al. Toll-like receptor-triggered calcium mobilization protects mice against bacterial infection through extracellular ATP release. *Infect. Immun.* 2014, Dec; 82 (12): 5076-5085.
44. Romio M., Reinbeck B., Bongardt S. et al. Extracellular purine metabolism and signaling of CD73-derived adenosine in murine Treg and T_H17 cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2011, Aug; 301 (2): 530-539.
45. Schenk U., Frascoli M., Proietti M. et al. ATP inhibits the generation and function of regulatory T cells through the activation of purinergic P2X receptors. *Sci. Signal.* 2011, Mar 1; 4 (162): ra12.

46. Schenk U., Westendorf A.M., Radaelli E. et al. Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. *Sci. Signal.* 2008, Sep. 30; 1 (39): ra6.
47. Schuler P.J., Harasymczuk M., Schilling B. et al. Separation of human CD4+CD39+ T cells by magnetic beads reveals two phenotypically and functionally different subsets. *J. Immunol. Methods.* 2011, Jun 30; 369 (1-2): 59-68.
48. Shieh C.H., Heinrich A., Serchov T. et al. P2X7-dependent, but differentially regulated release of IL-6, CCL2, and TNF- α in cultured mouse microglia. *Glia.* 2014, Apr; 62 (4): 592-607. doi:10.1002/glia.22628. Epub 2014 Jan 28.
49. Shoji K.F., Sáez P.J., Harcha P.A. et al. Pannexin1 channels act downstream of P2X 7 receptors in ATP-induced murine T-cell death. *Channels (Austin).* 2014, 8 (2): 142-156.
50. Sung S.S., Young J.D., Origlio A.M. et al. Extracellular ATP perturbs transmembrane ion fluxes, elevates cytosolic Ca²⁺, and inhibits phagocytosis in mouse macrophages. *J. Immunol.* 2001, Feb 1; 166 (3): 1611-1617.
51. Velasquez S., Eugenin E.A. Role of Pannexin-1 hemichannels and purinergic receptors in the pathogenesis of human diseases. *Front Physiol.* 2014, Mar 14.
52. Weber F.C., Esser P.R., Müller T. et al. Lack of the purinergic receptor P2X (7) results in resistance to contact hypersensitivity. *J. Exp. Med.* 2010, Nov 22; 207 (12): 2609-2619.
53. Wiley J.S., Sluyter R., Gu B.J. et al. The human P2X7 receptor and its role in innate immunity. *Tissue Antigens.* 2011, Nov; 78 (5): 321-332.
54. Xie R., Xu J., Wen G. et al. The P2Y2 nucleotide receptor mediates the proliferation and migration of human hepatocellular carcinoma cells induced by ATP. *J. Biol. Chem.* 2014, Jul 4; 289 (27): 19137-19149.
55. Yao Y., Levings M.K., Steiner T.S. ATP conditions intestinal epithelial cells to an inflammatory state that promotes components of DC maturation. *Eur. J. Immunol.* 2012, Dec; 42 (12): 3310-3321.
56. Yip L., Woehrle T., Corriden R. et al. Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors. *FASEB J.* 2009, Jun; 23 (6): 1685-1693.

Поступила 30.06.15

Контактная информация: Семенова Ирина Борисовна, д.м.н.,
105064, Москва, М. Казенный пер., 5а, р.т. (495)917-49-00

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

И.П.Балмасова, Р.И.Сепиашвили, Е.С.Малова

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ ВИРУСА ГЕПАТИТА В И ИММУНОПАТОГЕНЕЗ ХРОНИЧЕСКОГО ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА В

Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова, Российский университет дружбы народов, Москва

Хронический гепатит В относится к категории социально значимых заболеваний в силу своей широкой распространенности во всем мире и высокой частоты неблагоприятных исходов этого заболевания. В основе развития хронической формы гепатита В лежат особенности взаимодействия вируса гепатита В с иммунной системой человека, сопровождающиеся развитием механизмов ускользания возбудителя от иммунологического надзора. В основе указанных механизмов лежат молекулярно-биологические особенности вируса гепатита В, рассмотрение которых входит в содержание данного обзора. При этом в основу характеристики взаимодействия вирусных белков с клетками иммунной системы положены стадии иммунопатогенеза данного заболевания, выделение которых принято в современной зарубежной литературе.

Журн. микробиол., 2016, № 2, С. 119—126

Ключевые слова: вирус гепатита В (ВГВ), репликация ВГВ, хронический гепатит В, иммунопатогенез, субпопуляции Т-лимфоцитов

MOLECULAR BIOLOGY OF HEPATITIS B VIRUS AND IMMUNOPATHOGENESIS OF CHRONIC VIRAL HEPATITIS B

Evdokimov Moscow State Medical Stomatological University, Russian University of Peoples' Friendship, Moscow, Russia

Chronic hepatitis B belongs to a category of socially significant diseases due to its wide abundance in the world and high frequency of unfavourable outcomes of this disease. Features of interaction of hepatitis B virus with human immune system, accompanying development of mechanisms of escape from immunological control, is the basis of development of chronic hepatitis B. Molecular-biological features of hepatitis B virus are the basis of the indicated mechanisms, and the content of this review is their examination. Herewith, stages of immunopathogenesis of this disease is the basis of characteristics of interaction of viral proteins with cells of immune system, and isolation of those is accepted in contemporary foreign literature.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 2, P. 119—126

Key words: hepatitis B virus (HBV), HBV replication, chronic hepatitis B, immunopathogenesis, T-lymphocyte subpopulations

Вирусный гепатит В, несмотря на успехи вакцинации и противовирусной терапии данного заболевания, остается одной из актуальных медико-социальных проблем человечества. В мире насчитывается 350 — 400 млн человек, хронически инфицированных вирусом гепатита В (ВГВ), распространенность ВГВ-инфекции в разных странах колеблется от 0,1 до 20% [4, 37], и ежегодно около 1 млн человек умирают от ассоциированных с ВГВ-инфекцией причин [4, 36].

Хроническая инфекция, вызванная вирусом гепатита В (ХГВ), в 10 — 30% случаев связана с повышенным риском развития прогрессирующей болезни печени, сопровождающейся фиброзными и цирротическими изменениями в этом органе [1, 36, 28, 41]. В течение 5 лет примерно у каждого четвертого пациента с циррозом, обусловленным гепатитом В, наступает декомпенсация функции печени, еще у 5 — 10% пациентов развивается гепатоклеточная карцинома. Без лечения примерно 15% пациентов с циррозом умирают в течение 5 лет [33, 34].

В основе хронизации ВГВ-инфекции, патогенеза воспалительных и фиброзных изменений в печени, а также онкогенеза при развитии хронического гепатита В лежат сложные взаимодействия между вирусом и клетками макроорганизма, с иммунной системой организма-хозяина [4, 5, 7, 42]. Клинико-экспериментальные исследования этой проблемы уже приносят свои плоды в виде разработки способов диагностической оценки заболевания, его профилактики и лечения. Тем не менее, новые сведения о механизмах иммунопатогенеза хронического гепатита В постоянно требуют осмысления и служат основой для рождения новых идей.

ВИРУС ГЕПАТИТА В, ЕГО СТРУКТУРА И РЕПЛИКАЦИЯ

Вирус гепатита В — гепатотропный ДНК-содержащий вирус семейства *Hepadnaviridae*, вызывает острую и хроническую инфекцию печени, экспрессируя при этом довольно скудный репертуар вирусных белков [50].

Вирус гепатита В во многом уникален. Его геном представлен двуцепочечной молекулой ДНК — наименьшей из всех ныне идентифицированных у ДНК-содержащих вирусов. ДНК ВГВ состоит приблизительно из 3200 нуклеотидов и имеет линейную структуру. Наружная минус-цепь длиннее внутренней плюс-цепи на 15 — 45%. Минус-цепь в двунитевой части имеет разрыв на 5'-конце, к которому ковалентно присоединен белок с ферментативной активностью — обратная транскриптаза вируса. Плюс-цепь ДНК ВГВ также имеет линейную структуру с малой молекулой РНК на 5'-конце. Молекулы ДНК ВГВ заключены в белковую оболочку, состоящую из белка кора с антигенной структурой, обозначаемой как HBsAg, и белка прерора — HBeAg. Снаружи располагаются белки конверта — HBsAg, S1 (M), S2 (L) [9, 46, 52].

Ранние этапы жизненного цикла ВГВ в гепатоцитах включая проникновение ви-

руса, его раздевание, миграцию вирусного генома в ядро клетки раскрыты не полностью.

Так, известно, что в начале инфекционного процесса минус-цепь вирусного генома замыкается с образованием закрытой циркулярной ДНК в результате отсоединения обратной транскриптазы и малой РНК. Закрытая циркулярная ДНК служит матрицей для трех молекул вирусной матричной РНК (мРНК), а также так называемой прегеномной РНК (пгРНК), а сам процесс транскрипции зависит от большого числа печеночных транскрипционных факторов. Кроме того, вирусная ДНК обладает способностью к встраиванию в геном гепатоцита [26, 50].

Прегеномная РНК является основой для синтеза белков нуклеокапсида вируса и вирусной обратной транскриптазы. Этот процесс осуществляется в эндоплазматическом ретикулуле после выхода прегеномной RNA из ядра в цитоплазму гепатоцита. Вновь образовавшаяся обратная транскриптаза присоединяется к 5'-концу молекул прегеномной РНК, и этот комплекс упаковывается в нуклеокапсид, внутри которого начинается синтез вирусной ДНК. Вначале образуется минус цепь, которая, в свою очередь, служит матрицей для синтеза плюс-цепи. В результате формируется двуцепочечная вирусная ДНК, а нуклеокапсид достигает зрелости, покрываясь белками конверта после присоединения к эндоплазматической сети. Кроме того, вновь образованный нуклеокапсид может пополнять число кольцевых ДНК, образующихся в цитоплазме клетки с участием обратной транскриптазы [29, 50].

Другие три непрегеномные мРНК кодируют синтез поверхностных белков конверта и дополнительных генных продуктов ВГВ [29]. При репликации вирусных частиц синтезируются 3 типа поверхностных полипептидов конверта: L (длинные), M (средние) и S (короткие). Последние, образующиеся в избытке, традиционно именуются как HBsAg и наиболее часто определяются в крови инфицированных ВГВ [46, 52].

Функции дополнительных генных продуктов ВГВ — е антигена (HBeAg) и X-белка вируса (HBxP) очень тесно связаны с патогенезом хронического гепатита В и его исходами. Для X-белка вируса доказано участие в онкогенезе, HBeAg, как уже говорилось, представляет собой конечный продукт процессинга одной из четырех вирусных РНК, образующихся в ходе транскрипции кольцевой ДНК [46]. Известно, что обнаружение данного антигена в циркуляторном русле ВГВ-инфицированных является суррогатным маркером высокого уровня вирусной репликации [46, 52]. В зависимости от присутствия или отсутствия данного антигена в крови различают соответственно HBeAg-позитивный или HBeAg-негативный варианты течения хронического гепатита В [11]. Первый характеризуется более тяжелым течением с непредсказуемыми спонтанными вспышками печеночного воспаления, быстро прогрессирующего в выраженный фиброз печени [13].

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ВИРУСА ГЕПАТИТА В

Столь сложный путь репликации вируса гепатита В, его тесная и разнообразная функциональную взаимосвязь с человеческим организмом порождают высокую вероятность изменчивости ВГВ.

Действительно, геном ВГВ проявляет определенную нуклеотидную дивергенцию, в соответствии с которой выделяют 8 основных генотипов этого вируса (А—Н). Исследования показали различное географическое распространение генотипов ВГВ. Так, генотип А чаще определялся на севере Европы, в Северной Америке, Индии, ряде стран Африки. Генотипы В и С преобладали в Восточной Азии и Тихоокеанском регионе, генотип D — в Центральной Европе, Среднем Востоке, части Центральной Азии, Северной Америки, Индии, Африки. Генотип Е был идентифицирован в Африке, генотипы F и H — в Центральной и Южной Америке, генотип G — во Франции, Германии, Мексике, США. Установлена взаимосвязь между генотипом вируса и клиническими проявлениями, а также эффективностью противовирусной терапии ВГВ-инфекции [23, 40, 43, 45].

Основным объектом мутации в процессе формирования генотипических вариантов у ВГВ, по мнению E. Domingo et al. [23], служит закрытая циркулярная ДНК. Именно закрытая циркулярная ДНК служит основой репликативной памяти гепатоцита и способствует эволюции ВГВ [31]. Именно закрытая циркулярная ДНК отвечает за развитие латентной ВГВ-инфекции у пациентов с низким уровнем или отсутствием поверхностного HBsAg, антител против HBsAg, низким уровнем или недектируемой ДНК вируса в сыворотке крови [17, 44]. Персистенция закрытой циркулярной ДНК ВГВ и возможность ее интегрироваться в клеточный геном способствуют развитию гепатоклеточной карциномы [49, 55].

Многовариантный характер ВГВ не только влияет на эффективность противовирусной терапии вызываемого им заболевания, но и в значительной мере определяет патогенез ВГВ-инфекции и особенности развития иммунного ответа на этот вирус [22, 53].

Известно, что ВГВ не оказывает прямого цитопатического действия на клетки печени [1, 24, 54]. Один из типичных процессов, приводящих к гибели печеночных клеток при ХГВ, их апоптоз. В литературе имеются данные о том, что сам ВГВ напрямую и некоторые его белки (НВхР и НВсАг) способны индуцировать апоптоз гепатоцитов, в частности, TRAIL-опосредованным механизмом [18], доводя количество гибнущих клеток до клинически значимого уровня [35, 47]. Каков бы ни был механизм клеточной гибели при ВГВ-инфекции, любое повреждение ткани печени при данной инфекции является следствием иммунной агрессии против вирусных антигенов с участием цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+, Т цтл) [1,2,3, 24, 38, 42]. Установлено, что степень повреждения гепатоцитов не имеет причинно-следственной связи с вирусной нагрузкой; не подтверждена также и ассоциация Т-клеточного повреждения ткани печени с НВсАг-позитивностью больных [27]. Тем не менее, каждый из основных вирусных белков в составе ВГВ или формирующихся в процессе вирусной репродукции обладает способностью влияния на иммунный процесс.

НВсАг ВИРУСА ГЕПАТИТА В И ЕГО РОЛЬ В ИНДУКЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ В

Говоря об индукции иммунного ответа при ВГВ-инфекции, необходимо подчеркнуть, что отдельные структурные компоненты вируса обладают различными механизмами воздействия на иммунную систему и в значительной степени определяют развитие хронического инфекционного процесса, его прогрессирование и исходы [4].

Патогенез ВГВ-инфекции во многом обусловлен взаимодействием клеток иммунной системы с гепатоцитами, презентирующими антигены ВГВ, в первую очередь, НВсАг. Указанный белок кора обладает способностью стимулировать иммунный ответ как Т-независимым, так и Т-зависимым механизмом [39, 51].

Т-независимый механизм обусловлен способностью нативного белка кора упаковываться в частицы, состоящие из многих копий этого белка, что создает возможность одновременного представления его эпитопов в концентрированном виде, что приводит к оптимальной связи этих эпитопов с распознающими рецепторами В-лимфоцитов и активации последних [25]. В результате возникает иммунный ответ, сопровождающийся активной выработкой антител на названный антиген. В то же время, необходимо подчеркнуть, что реализации этого механизма препятствует внутриклеточная локализация вирусного антигена, его маскировка в составе вириона белками конверта [4].

Параллельно идет презентация белков кора пораженными гепатоцитами для Т-клеточного звена иммунной системы, в результате чего НВсАг потенциально способен индуцировать довольно эффективный клеточный иммунный ответ с участием CD8+ Т-лимфоцитов, направленный против инфицированных гепатоцитов. При оптимальных условиях CD8+ Т-лимфоциты являются главными эффекторными иммунными клетками, ограничивающими в ходе острой ВГВ-инфекции активную репликацию и распространение вируса [57] посредством киллинга инфицированных гепатоцитов [24, 36, 54].

В работах последних лет появились сведения о том, что при остром гепатите В удалось зарегистрировать в крови НВсАг-специфичные CD4+ Т-лимфоциты, продуцирующие ИЛ-21 [32]. Можно предположить, что даже небольшое количество растворимого НВсАг, попадающее в кровотоки при разрушении вирионов или цитолизе инфицированных гепатоцитов, может взаимодействовать с рецепторами В-лимфоцитов и презентироваться ими CD4+ Т-клеткам. Как бы то ни было, но способность НВсАг стимулировать как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ используется в настоящее время при конструировании терапевтических вакцин против хронического гепатита В [14, 19], поскольку у 5 — 10% взрослых острый вирусный гепатит В переходит в хроническую форму [38, 41].

НВсАг ВИРУСА ГЕПАТИТА В И ЕГО РОЛЬ В ИНДУКЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ В

НВсАг играет важную роль в процессах взаимодействия вируса с иммунной системой, особенно на этапе презентации вирусных антигенов и распознавания их CD4+ лимфоцитами [7, 27, 56]. Этот антиген выполняет функции важнейшего маркера этапов иммунопатогенеза хронического гепатита В. Дело в том, что иммунопатогенез ХГВ в своем про-

грессирующем развитии проходит 4 стадии, каждая из которых, помимо определенных иммунологических сдвигов, сопровождается характерными клиническими и морфологическими изменениями [16, 47].

На первой стадии иммунной толерантности ХГВ характеризуется присутствием в сыворотке больных HBeAg, высокой вирусной нагрузкой, референсным сывороточным уровнем аминотрансфераз и минимальными воспалительными изменениями (или их отсутствием), определяемыми при биопсии печени. Описанное состояние иммунологической толерантности к HBeAg показательно для лиц, инфицированных в период новорожденности или в раннем детстве, и редко встречается у взрослых пациентов с ХГВ [47].

На этой стадии HBeAg выполняет иммунорегуляторные функции, способствует накоплению у больных CD4⁺ регуляторных Т-клеток с иммуносупрессорной активностью и подавлению цитотоксического Т-клеточного лизиса инфицированных гепатоцитов, что приводит к хронизации процесса [30, 47]. Действительно в современной литературе существуют сведения о роли CD4⁺, CD25⁺ регуляторных Т-клеток (FoxP3⁺) в развитии иммунологической толерантности при ХГВ [37, 48], показано, что основным индуктором таких Treg выступает HBeAg, хотя и, как правило, в комплексе с HBcAg.

Описан один из возможных механизмов толерогенного действия HBeAg. Так, предполагается, что в результате неонатальной или пренатальной ВГВ-инфекции секреция мономерного HBeAg гепатоцитами в условиях преимущественно Th2-ориентированной иммунной системы новорожденного приводит к активации HBeAg-специфичных Th2-клеток и продукции ими цитокинов, в том числе иммуносупрессорного действия (ИЛ-10). Это способствует подавлению воспалительного компонента инфекционного процесса и индукции регуляторных Т-клеток, в том числе и в результате возможного попадания HBeAg в тимус.

В ходе второй стадии иммунопатогенеза (стадии иммунного «очищения») ВГВ-инфекции происходит переход от состояния Th2-толерантности к активации Th1 клеток, нормализуется процесс распознавания антигенных детерминант ВГВ, появляются клоны низкоавидных HBeAg-специфических Т-хелперных лимфоцитов, снижается сывороточная концентрация HBeAg, подавляется репликация вируса, уменьшается вирусная нагрузка в крови. Однако параллельно закономерно усиливается секреция ИЛ-2, интерферона- γ и фактора некроза опухолей, нарастают опосредованные иммунными механизмами повреждения гепатоцитов и воспалительные изменения в печени, повышается активность сывороточных аминотрансфераз (в большей степени АЛТ) и, как следствие, возрастает вирусная нагрузка в крови, усиливаются фиброзные изменения в печени. Процесс переходит в активную фазу 2 стадии ХГВ [47], которая сопровождается ростом в печени активности Th17, индуцирующих воспалительный процесс [12]. По мнению ряда исследователей [6], именно в эту фазу хронической ВГВ-инфекции на пике воспалительной активности всех задействованных в процессе систем происходит ключевое событие при ХГВ — спонтанная сероконверсия HBeAg (то есть исчезновение из кровотока HBeAg и появление антител к данному антигену — AntiHBeAg) [6, 47]. Другие авторы придерживаются мнения, что сероконверсия HBeAg совпадает с ремиссией воспалительного процесса в печени [26]. При любом варианте сероконверсия HBeAg знаменует переход в иммунную стадию 3 течения ХГВ — стадию неактивного носительства HBsAg.

В 20 — 30% случаев неактивного носительства HBsAg происходит спонтанная реактивация гепатита В с риском развития прогрессирующего повреждения печени, декомпенсации печеночной функции, неблагоприятных исходов инфекции. Этот переход ХГВ к стадии реактивации иммунного процесса не всегда сопровождается реверсией HBeAg, поскольку вследствие многочисленных генных мутаций ВГВ может утрачивать способность к продукции данного антигена [8, 12, 47]. По мнению ряда авторов, утрата основного белка мишени для специфического иммунного ответа макроорганизма (HBeAg) может быть проявлением попытки уклонения ВГВ от иммунологического надзора путем целенаправленной мутации [20, 47]. Отсутствие циркулирующих HBeAg в очередной раз снижает активность специфического Th2-ответа и приводит к преобладанию Th1-опосредованного клеточного воспаления в печени [3, 6, 47]. Сравнительные исследования показали, что у HBeAg позитивных пациентов регистрируются более высокие показатели уровня АЛТ и ДНК ВГВ в крови, однако вследствие более выраженной активности фибротических процессов в печени у HBeAg негативных больных пессимистичнее долгосрочный прогноз

течения болезни, чаще в исходе ХГВ формируются цирроз печени и гепатоклеточная карцинома, реже происходит спонтанная инактивация процесса [24, 47].

HBsAg ВИРУСА ГЕПАТИТА В И ЕГО РОЛЬ В ИНДУКЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ В

Носители HBsAg составляют подавляющую группу больных ХГВ. Морфологические изменения в печени у таких больных варьируют в диапазоне от отсутствия или минимальных фиброзных изменений до вялотекущего цирроза [6, 47]. Долгосрочные эпидемиологические исследования показывают, что после сероконверсии у большинства носителей HBsAg сохраняется HBeAg негативный статус в сочетании с низким или неопределяемым уровнем ДНК ВГВ в крови при минимальной активности ферментативных печеночных систем. Меньшую группу носителей HBsAg составляют пациенты с преходящей биохимической и вирусологической активностью процесса [47]. Ежегодно у 1 — 2% находящихся на данной стадии инфекционного процесса пациентов независимо от выраженности фиброза печени происходит самопроизвольное исчезновение HBsAg из кровотока, что, однако, не предотвращает в полной мере вероятность формирования у них декомпенсации печеночной функции и развития гепатоклеточной карциномы [10, 47].

Как уже указывалось, вирусная ДНК обладает способностью встраиваться (интегрировать) в геном гепатоцитов и сохраняться в них (персистировать) в виде минихромосом в течение всего периода жизни этих долгоживущих клеток (от нескольких месяцев до нескольких лет), причем процессы интеграции и репликации ВГВ в печени могут протекать параллельно. При этом интегрированная ДНК может служить шаблоном для независимой транскрипции мРНК HBsAg, что объясняет постоянное присутствие данного антигена в крови ВГВ-инфицированных даже в отсутствие репликации ДНК. Далее в процессе деления гепатоцитов может происходить асимметричное распределение ДНК ВГВ между клетками-потомками. Это позволяет вирусу создавать мутантные копии генома и обеспечивает длительное внутрипеченочное выживание вируса-мутанта вне контроля иммунной системы, а также в условиях противовирусной терапии [27, 46]. Таким образом, процесс интеграции не обеспечивает репродукцию вирусных частиц, но способствует длительному сохранению (персистенции) ВГВ в инфицированных гепатоцитах.

Существует еще один молекулярный механизм ускользания вируса от иммунной системы организма хозяина. Так, образующиеся в клетках печени поверхностные антигены (HBsAg) ввиду их способности к быстрой полимеризации остаются невосприимчивыми к деградации клеточными протеасомами эндоплазматического ретикула гепатоцитов, что препятствует их презентации цитотоксическим Т-лимфоцитам (ЦТЛ) молекулами главного комплекса гистосовместимости I класса (МНС-I) и позволяет длительно оставаться невидимыми для иммунных клеток [9, 46].

Свою лепту в иммунопатогенез хронического гепатита В вносит и такой белок ХГВ, как Х-протеин. Этот белок действует как потенциальный активатор транскрипции и стимулирует генерацию активных кислородных радикалов с их мутагенным эффектом, что может способствовать опухолевой трансформации гепатоцитов [15].

Описанные в обзоре стадии иммунопатогенеза хронического гепатита В, охарактеризованные в зарубежной литературе последних лет, не исчерпывают всех иммунологических сдвигов, сопровождающих развитие хронического гепатита В. Так, за рамки обсуждения остались клетки врожденного иммунного ответа и целый пласт иммунологических сдвигов, связанных с этими клетками. Тем не менее, следует признать, что обсуждаемая в настоящем обзоре взаимосвязь между ВГВ-белками и клетками адаптивного иммунного ответа отражает ключевые события, происходящие в иммунной системе при данном заболевании.

В связи с этим, целесообразно подчеркнуть, что предпосылки для хронизации ВГВ-инфекции заложены в молекулярной биологии вируса, его способности к мутациям и особом образе взаимодействия белков ВГВ с иммунной системой организма-хозяина, сопровождающимся развитием так называемого феномена иммунологического ускользания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сепиашвили Р.И., Балмасова И.П. Кабанова Е.В. и др. Вирус гепатита В: биология, иммунопатогенез, система ЕК/ЕКТ при вирусной персистенции. Журн. микробиол. 2006, 6: 76-83.
2. Сепиашвили Р.И., Балмасова И.П. Иммунные синапсы: от теории к клинической практике. Молекулярная медицина. 2008, 1: 14-22.

3. Сепиашвили Р.И., Балмасова И.П. Естественные киллеры и биогенные амины: паракринная регуляция в иммунной системе. *Росс. физиол. журн. им. И.М.Сеченова*. 2005, 8: 927.
4. Araki K., Miyazaki J., Hino O. et al. Expression and replication of hepatitis B virus genome in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989, 86 (1): 207-211.
5. Balmasova I.P., Yushchuk N.D., Mynbaev O.A. et al. Immunopathogenesis of chronic hepatitis B. *World. J. Gastroenterol.* 2014, 20 (39): 14156-14171.
6. Baumert T.F., Thimme R., von Weizsäcker F. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *World. J. Gastroenterol.* 2007, 13 (1): 82-90.
7. Beckebaum S., Cicinnati V.R., Zhang X. et al. Hepatitis B virus-induced defect of monocyte-derived dendritic cells leads to impaired T helper type 1 response in vitro: mechanisms for viral immune escape. *Immunology*. 2003, 109 (4): 487-495.
8. Bertoletti A., Gehring A.J. The immune response during hepatitis B virus infection. *J. Gen. Virol.* 2006, 87 (6): 1439-1449.
9. Biron C.A., Nguyen K.B., Pien G.C. et al. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Ann. Rev. Immunol.* 1999, 17: 189-220.
10. Block T.M., Guo H., Guo J.T. Molecular virology of hepatitis B virus for clinicians. *Clin. Liver. Dis.* 2007, 11 (4): 685-706.
11. Block T.M., Mehta A.S., Blumberg B.S. et al. Does rapid oligomerization of hepatitis B envelope proteins play a role in resistance to proteasome degradation and enhance chronicity? *DNA Cell Biol.* 2006, 25 (3): 165-170.
12. Bonino F., Brunetto M.R. Chronic hepatitis B e antigen (HBeAg) negative, anti-HBe positive hepatitis B: an overview. *J. Hepatol.* 2003, 39 (1): 160-163.
13. Bronte V., Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat. Rev. Immunol.* 2005, 8: 641-654.
14. Brunetto M.R., Oliveri F., Coco B. et al. Outcome of anti-HBe positive chronic hepatitis B in alpha-interferon treated and untreated patients: a long term cohort study. *J. Hepatol.* 2002, 36 (2): 263-270.
15. Buchmann P., Dembek C., Kuklick L. et al. A novel therapeutic hepatitis B vaccine induces cellular and humoral immune responses and breaks tolerance in hepatitis B virus (HBV) transgenic mice. *Vaccine*. 2013, 31 (3): 1197-1203.
16. Carson W.E., Fehniger T.A., Caligiuri M.A. CD56bright natural killer cell subsets: characterization of distinct functional responses to interleukin-2 and the c-kit ligand. *Eur. J. Immunol.* 1997, 27 (2): 354-360.
17. Chang J.J., Lewin S.R. Immunopathogenesis of hepatitis B virus infection. *Immunol. Cell. Biol.* 2007, 85 (1): 16-23.
18. Chemin I., Trépo C. Clinical impact of occult HBV infections. *J. Clin. Virol.* 2005, 34 (1): 15-21.
19. Chen G.Y., He J.Q., Lv G.C. et al. Involvement of TRAIL up-regulation of CD4+, CD8+ T cells in liver injury in chronic hepatitis B. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2004, 12 (5): 284-286.
20. Chen C.H., Lee C.M., Lu S.N. et al. Clinical significance of hepatitis B virus (HBV) genotypes and precore and core promoter mutations affecting HBV e antigen expression in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43(12): 6000-6006.
21. Chen M., Sällberg M., Hughes J. et al. Immune tolerance split between hepatitis B virus precore and core proteins. *J. Virol.* 2005, 79 (5): 3016-3027.
22. Das A., Hoare M., Davies N. et al. Functional skewing of the global CD8 T cell population in chronic hepatitis B virus infection. *J. Exp. Med.* 2008, 205 (9): 2111-2124.
23. Deng L., Tang H. Hepatitis B virus drug resistance to current nucleos(t)ide analogs: Mechanisms and mutation sites. *Hepatol. Res.* 2011, 41 (11): 1017-1024.
24. Domingo E., Sheldon J., Perales C. Viral quasispecies evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2012, 76 (2): 159-216.
25. Dunn C., Brunetto M., Reynolds G. et al. Cytokines induced during chronic hepatitis B virus infection promote a pathway for NK cell-mediated liver damage. *J. Exp. Med.* 2007, 204 (3): 667-680.
26. Fehr T., Skrastina D., Pumpens P. et al. T cell-independent type I antibody response against B cell epitopes expressed repetitively on recombinant virus particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998, 95 (16): 9477-9481.
27. Ganem D., Schneider R.J. Hepadnaviridae: The viruses and their replication. *In: Knipe D.M. et al. (ed.). Fields Virology*, Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins. 2001, p. 2923-2969.
28. Hui C.K., Lau G.K. Immune system and hepatitis B virus infection. *J. Clin. Virol.* 2005, 34 (1): 44-48.
29. Janssen H.L., van Zonneveld M., Schalm S.W. Hepatitis B. *N. Engl. J. Med.* 2004, 350 (26): 2719-2720.

30. Kay A., Zoulim F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus. Res.* 2007, 127 (2): 164-176.
31. Kimura K., Kakimi K., Wieland S. et al. Activated intrahepatic antigen-presenting cells inhibit hepatitis B virus replication in the liver of transgenic mice. *J. Immunol.* 2002, 169 (9): 5188-5195.
32. Levrero M., Pollicino T., Petersen J. et al. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 2009, 51 (3): 581-592.
33. Li L., Liu M., Cheng L.W. et al. HBcAg-specific IL-21-producing CD4+ T cells are associated with relative viral control in patients with chronic hepatitis B. *Scand. J. Immunol.* 2013, 78 (5): 439-446.
34. Liang T.J. Hepatitis B: the virus and disease. *Hepatology.* 2009, 49 (5): 13-21.
35. Liaw Y.F., Brunetto M.R., Hadziyannis S. The natural history of chronic HBV infection and geographical differences. *Antivir. Ther.* 2010, 15 (3): 25-33.
36. Lu Y.W., Tan T.L., Zhang J. et al. Cellular apoptosis induced by replication of hepatitis B virus: possible link between viral genotype and clinical outcome. *Virol. J.* 2007, 4: 117.
37. Malova E.S., Balmasova I.P., Shmeleva E.V. et al. Immunologic signs of fibrous changes debut in the liver of patients with chronic hepatitis B. *In: Advances in allergy, asthma and immunology: from basic science to clinical management.* R.Sepiashvili (ed.). Medimond International Proceedings, 2010.
38. Mamun A.A., Mahtab M.A., Akbar S.M.F. et al. Impact of viral load on liver damage in Bangladesh. *J. Gastroenterol. Hepatol. Res.* 2013, 2: 824-826.
39. Meuleman P., Libbrecht L., Wieland S. et al. Immune suppression uncovers endogenous cytopathic effects of the hepatitis B virus. *J. Virol.* 2006, 80 (6): 2797-2807.
40. Milich D.R., McLachlan A. The nucleocapsid of hepatitis B virus is both a T-cell-independent and a T-cell-dependent antigen. *Science.* 1986, 234 (4782): 1398-1401.
41. Norder H., Couroucé A.M., Magnius L.O. Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. *J. Gen. Virol.* 1992, 73 (12): 3141-3145.
42. Pol S. Natural history of hepatitis B infection. *Presse Med.* 2006, 35 (2): 308-316.
43. Ratnam D., Visvanathan K. New concepts in the immunopathogenesis of chronic hepatitis B: the importance of the innate immune response. *Hepatol. Int.* 2008, 2 (1): 12-18.
44. Roman S., Panduro A. HBV endemicity in Mexico is associated with HBV genotypes H and G. *World J. Gastroenterol.* 2013, 19 (33): 5446-5453.
45. Said Z.N. An overview of occult hepatitis B virus infection. *World J. Gastroenterol.* 2011, 17 (15): 1927-1938.
46. Schaefer S. Hepatitis B virus: significance of genotypes. *J. Viral. Hepat.* 2005, 12 (2): 111-124.
47. Seeger C., Mason W.S. Hepatitis B virus biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000, 64 (1): 51-68.
48. Shi Y.H., Shi C.H. Molecular characteristics and stages of chronic hepatitis B virus infection. *World J. Gastroenterol.* 2009, 15 (25): 3099-3105.
49. Stoop J.N., van der Molen R.G., Baan C.C. et al. Regulatory T cells to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology.* 2005, 41 (4): 771-778.
50. Tamori A., Nishiguchi S., Kubo S. et al. HBV DNA integration and HBV-transcript expression in non-B, non-C hepatocellular carcinoma in Japan. *J. Med. Virol.* 2003, 71 (4): 492-498.
51. Tavis J. The replication strategy of the Hepadnaviruses. *Viral Hepatitis Rev.* 1996, 2: 205-218.
52. van der Molen R.G., Sprengers D., Binda R.S. et al. Functional impairment of myeloid and plasmacytoid dendritic cells of patients with chronic hepatitis B. *Hepatology.* 2004, 40 (3): 738-746.
53. Vanlandschoot P., Cao T., Leroux-Roels G. The nucleocapsid of the hepatitis B virus: a remarkable immunogenic structure. *Antiviral. Res.* 2003, 60 (2): 67-74.
54. Wiegand J., Hasenclever D., Tillmann H.L. Should treatment of hepatitis B depend on hepatitis B virus genotypes? A hypothesis generated from an explorative analysis of published evidence. *Antivir. Ther.* 2008, 13 (2): 211-220.
55. Wieland S., Thimme R., Purcell R.H. et al. Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004, 101 (17): 6669-6674.
56. Wong D.K., Huang F.Y., Lai C.L. et al. Occult hepatitis B infection and HBV replicative activity in patients with cryptogenic cause of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2011, 54 (3): 829-836.
57. You J., Sriplung H., Geater A. et al. Effect of viral load on T-lymphocyte failure in patients with chronic hepatitis B. *World J. Gastroenterol.* 2008, 14 (7): 1112-1119.
58. Zhang H.H., Mei M.H., Fei R. et al. Regulatory T cells in chronic hepatitis B patients affect the immunopathogenesis of hepatocellular carcinoma by suppressing the anti-tumour immune responses. *J. Viral. Hepat.* 2010, 17 (1): 34-43.

Поступила 23.08.15

Контактная информация: Балмасова Ирина Петровна, д.м.н., проф.,
127473, Москва, Делегатская ул., 20/1

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Вишневецкая О.Н., Рыбальченко О.В., Ларионов И.В., Орлова О.Г., Марков А.Г.* Сравнительный анализ плотных контактов эпителия тощей кишки крыс при действии липополисахарида и холерного токсина 3
- Терлецкий В.П., Тыщенко В.И., Новикова О.Б., Новикова И.И., Джавадов Э.Д.* Новый подход к генотипированию госпитальных изолятов *Clostridium difficile* 9
- Точилина А.Г., Белова И.В., Соловьева И.В., Горлова И.С., Иванова Т.П., Жирнов В.А.* Характеристика биологических и молекулярно-генетических свойств пробиотического штамма *Lactobacillus fermentum* 90 ТС-4 16
- Сычева М.В., Васильченко А.С., Рогожин Е.А., Пашкова Т.М., Попова Л.П., Карташова О.Л.* Биологическая активность антимикробных пептидов из тромбоцитов кур 24
- Тюрин Ю.А., Фассахов Р.С., Григорьева Т.В., Мустафин И.Г.* Микробный состав различных участков кожи при развитии атопического дерматита по данным метода MALDI-TOF масс-спектрометрической идентификации .. 30
- Довгополюк Е.С., Пузырева Л.В., Сафонов А.Д., Мордык А.В., Тюменцев А.Т., Левахина Л.И., Калачева Г.А.* Эпидемическая ситуация по ВИЧ-инфекции в Сибирском федеральном округе в 2014 году 37
- Дуванова О.В., Мишанкин Б.Н., Водопьянов А.С., Сорокин В.М.* N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза холерных вибрионов 41
- Маркушин С.Г., Свитич О.А., Кинкулькина А.Р., Коптяева И.Б., Лисовская К.В.* Механизмы аттенуации холодоадаптированного штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) 49
- Жуков В.А., Кокорев С.В., Рогожкина С.В., Мельников Д.Г., Терентьев А.И., Ковальчук Е.А., Вахнов Е.Ю., Борисевич С.В.* Термостабильность как прогностический показатель сохранности таблетированной живой эмбриональной оспенной вакцины (ТЭОВак) в процессе хранения 56
- Попова А.Ю., Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Василенко Н.Ф., Шапошникова Л.И., Котенев Е.С., Дубянский В.М., Волюнкина А.С., Лисицкая Я.В., Самарина И.В., Пеньковская Н.А., Евстафьев И.Л., Товпинец Н.Н., Цапко Н.В., Белова О.А., Агапитов Д.С., Самодед Т.Н., Надольный А.А., Коваленко И.С., Якунин С.Н., Шварсалон Н.К., Зинич Л.С., Тихонов С.Н., Лямкин Г.И., Жарникова И.В., Евченко Ю.М.* Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекциям в Крымском федеральном округе в 2014 — 2015 гг. 62

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Малецкая О.В., Тиболов А.Г., Прислегина Д.А., Газиева Г.К., Отараева Н.И., Волюнкина А.С., Савельев В.Н., Лямкин Г.И., Зайцев А.А., Куличенко А.Н.* Эпидемиологические особенности вспышки норовирусной инфекции в Республике Северная Осетия-Алания 69

ORIGINAL ARTICLES

- Vishnevskaya, O.N., Rybalchenko, O.V., Larionov, I.V., Orlova, O.G., Markov, A.G.* Comparative analysis of tight junctions of epithelium of rats jejunum under the effect of lipopolysaccharide and cholera toxin
- Terletsy, V.P., Tyschenko, V.I., Novikova, O.B., Novikova, I.I., Dzhavadov, E.D.* A novel approach to genotyping of hospital isolates of *Clostridium difficile*
- Tochilina, A.G., Belova, I.V., Solovieva, I.V., Gorlova, I.S., Ivanova, T.P., Zhirnov, V.A.* Characteristics of biological and molecular-genetic properties of *Lactobacillus fermentum* 90 TC-4 probiotic strain
- Sycheva, M.V., Vasilchenko, A.S., Rogozhin, E.A., Pashkova, T.M., Popova, L.P., Kartashova, O.L.* Biological activity of antimicrobial peptides from chickens thrombocytes
- Tyurin, Yu.A., Fassakhov, R.S., Grigorieva, T.V., Mustafin, I.G.* Microbial composition of various surfaces of skin during development of atopic dermatitis based on data from MALDI-TOF mass-spectrometry identification method
- Dovgopolyuk, E.S., Puzyreva, L.V., Safonov, A.D., Mordyk, A.V., Tyumentsev, A.T., Levakhina, L.I., Kalacheva, G.A.* Epidemic situation for HIV-infection in Siberian Federal Region in 2014
- Duvanov, O.V., Mishankin, B.N., Vodopianov, A.S., Sorokin, V.M.* N-acetyl-β-D-glucosaminidase of *Vibrio cholerae*
- Markushin, S.G., Svitich, O.A., Kinkulkina, A.R., Koptyaeva, I.B., Lisovskaya, K.V.* Mechanisms of attenuation of cold-adapted strain A/Krasnodar/101/35/59 (H2N2)
- Zhukov, V.A., Kokorev, S.V., Rogozhkina, S.V., Melnikov, D.G., Terentiev, A.I., Kovalchuk, E.A., Vakhnov, E.Yu., Borisevich, S.V.* Thermal stability as a prognostic indicator of conservation of live embryonic smallpox vaccine (TEOVac) during storage
- Popova, A.Yu., Kulichenko, A.N., Maletskaya, O.V., Vasilenko, N.F., Shaposhnikova, L.I., Kotenev, E.S., Dubyansky, V.M., Volynkina, A.S., Lisitskaya, Ya.V., Samarina, I.V., Penkovskaya, N.A., Evstafiev, I.L., Tovpinets, N.N., Tsapko, N.V., Belova, O.A., Agapitov, D.S., Samoded, T.N., Nadolny, A.A., Kovalenko, I.S., Yakunin, S.N., Shvarsalon, N.K., Zinich, L.S., Tikhonov, S.N., Lyamkin, G.I., Zharnikova, I.V., Evchenko, Yu.M.* Epidemiologic situation by natural-foci infections in the Crimea Federal District in 2014 — 2015

SHORT COMMUNICATIONS

- Maletskaya, O.V., Tibilov, A.G., Prislegina, D.A., Gazieva, G.K., Otaraeva, N.I., Volynkina, A.S., Saveliev, V.N., Lyamkin, G.I., Zaitsev, A.A., Kulichenko, A.N.* Epidemiologic features of norovirus infection outbreak in the Republic of North Ossetia-Alania

| | | | |
|--|-----|---|--|
| <i>Жукова Л.И., Рафеенко Г.К., Горodin В.Н., Ваниюков А.А.</i> Клинико-эпидемиологическая характеристика лихорадки Западного Нила в Краснодарском крае..... | 74 | <i>Zhukova, L.I., Rafeenko, G.K., Gorodin, V.N., Vanyukov, A.A.</i> Clinical-epidemiological characteristic of West Nile fever in Krasnodar Region | |
| <i>Гапон М.Н., Терновская Л.Н.</i> Выявление степени микроэкологических нарушений кишечника на основе расчета локального антиоксидантного индекса..... | 80 | <i>Gapon, M.N., Ternovskaya, L.N.</i> Detection of degree of microecological disturbance of intestine based on calculation of local antioxidant index | |
| <i>Телесманич Н.Р., Гончаренко Е.В., Чайка С.О., Чайка И.А., Теличева В.О.</i> Возможности применения MALDI-TOF масс-спектрометрии для изучения углевод-специфических рецепторов диагностического бактериофага эльтор..... | 85 | <i>Telesmanich, N.R., Goncharenko, E.V., Chaika, S.O., Chaika, I.A., Telicheva, V.O.</i> Possibilities of application of MALDI-TOF mass-spectrometry for study of carbohydrate-specific receptors for diagnostic bacteriophage El Tor | |
| ОБЗОРЫ | | REVIEWS | |
| <i>Гаврилов С.Н., Скачкова Т.С., Шипулина О.Ю., Савочкина Ю.А., Шипулин Г.А., Малеев В.В.</i> Современные молекулярно-генетические методы, используемые для этиологической диагностики сепсиса..... | 91 | <i>Gavrilov, S.N., Skachkova, T.S., Shipulina, O.Yu., Savochkina, Yu.A., Shipulin, G.A., Maleev, V.V.</i> Contemporary molecular-genetic methods used for etiologic diagnostics of sepsis | |
| <i>Ганковская Л.В., Хелминская Н.М., Молчанова Е.А., Свитич О.А.</i> Роль факторов врожденного иммунитета в патогенезе пародонтита..... | 100 | <i>Gankovskaya, L.V., Khelminskaya, N.M., Molchanova, E.A., Svitich, O.A.</i> Role of innate immunity factors in periodontitis pathogenesis | |
| <i>Семенова И.Б.</i> Роль пуриnergических рецепторов в иммунном ответе..... | 107 | <i>Semenova, I.B.</i> Role of purinergic receptors in immune response | |
| <i>Балмасова И.П., Сепиашвили Р.И., Малова Е.С.</i> Молекулярная биология вируса гепатита В и иммунопатогенез хронического вирусного гепатита В..... | 119 | <i>Balmasova, I.P., Sepiashvili, R.I., Malova, E.S.</i> Molecular biology of hepatitis B virus and immunopathogenesis of chronic viral hepatitis B | |

ПАМЯТИ КОНСТАНТИНА ГЕОРГИЕВИЧА ВАСИЛЬЕВА

26.09.15 на 96 году жизни в Одессе скончался Константин Георгиевич Васильев — эпидемиолог, автор ряда монографий по истории эпидемиологии, а также цикла монографий о жизни и деятельности выдающихся отечественных ученых Л.А.Тарасевича, Н.Ф.Гамалеи, Л.В.Громашевского и др.

К.Г.Васильев неоднократно печатался в ЖМЭИ.

Светлая память о К.Г.Васильеве сохранится в наших сердцах.
