

ISSN 0372.9311

ЖУРНАЛ

МИКРОБИОЛОГИИ  
ЭПИДЕМИОЛОГИИ  
И  
ИММУНОБИОЛОГИИ

Издательский  
дом



С-ИНФО

5 2016

JOURNAL

OF MICROBIOLOGY  
EPIDEMIOLOGY  
AND  
IMMUNOBIOLOGY



4 602607 000085

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.СЕПИШВИЛИ, 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.*

5

сентябрь—октябрь

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), ФРОЛОВА 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

Цена за полугодие:

Индексы 71436 и 16729 — 1 111 р. 44 к.

Индекс 1634 (адресная подписка через Сбербанк РФ) — 1 170 р.

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

<http://www.jmicrobiol.com>

---

Подписано в печать 14.09.16. Выход в свет 04.10.16. Формат 70x108 1/16  
Печать офсетная. Тираж 1000. Заказ 26-2016

---

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](http://www.redstarph.ru)  
E-mail: [kr\\_zvezda@mail.ru](mailto:kr_zvezda@mail.ru)

© «С-инфо», 2016

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

Е.А.Плетенева<sup>1</sup>, О.В.Шабурова<sup>1</sup>, М.В.Буркальцева<sup>1</sup>, С.В.Крылов<sup>1</sup>,  
 А.М.Каплан<sup>1</sup>, Е.Н.Чеснокова<sup>1</sup>, О.А.Полыгач<sup>1,2</sup>, Н.Н.Ворошилова<sup>2</sup>,  
 Н.А.Михайлова<sup>1</sup>, В.В.Зверев<sup>1</sup>, В.Н.Крылов<sup>1</sup>

## НОВЫЙ ПОДХОД К СОСТАВЛЕНИЮ СМЕСЕЙ БАКТЕРИОФАГОВ ДЛЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ

<sup>1</sup>НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва; <sup>2</sup>Филиал НПО «Микроген», Уфа

**Цель.** Оценить антибактериальную активность экспериментальной смеси из фагов, отнесенных к нескольким хорошо изученным видам. **Материалы и методы.** Работа проведена с использованием группы из 55 клинических штаммов *Pseudomonas aeruginosa* разного происхождения, четырех моновидовых смесей 32 вирулентных бактериофагов (виды phiKZ-, phiKMV-, phiPB1-, PaP3- подобные фаги) и двух новых фагов, phiMK (вида PaK-P2) и phiPerm5. Активность препаратов из моновидовых смесей бактериофагов разных видов сравнивали с активностью 3 коммерческих смесей. Использовали стандартные методы исследования бактериофагов: определение литической активности высевом на бактериальные газоны *P. aeruginosa*, рестрикционный анализ ДНК фагов для подтверждения их отнесения к тому или иному виду. **Результаты.** Показано, что суммарная антибактериальная активность шести моновидовых смесей вирулентных фагов сходна с литической активностью коммерческих терапевтических смесей, используемых против инфекций *P. aeruginosa*. Пятьдесят четыре из 55 штаммов клинических изолятов *P. aeruginosa* проявили чувствительность к экспериментальной смеси, составленной из моновидовых смесей бактериофагов. Пятьдесят три штамма лизировались коммерческими препаратами. При этом в экспериментальной смеси исключена возможность случайного включения умеренных бактериофагов. **Заключение.** Показана возможность создания высокоактивных терапевтических антибактериальных препаратов против *P. aeruginosa* с использованием моновидовых смесей 6 видов литических бактериофагов. Применение такой смеси в терапии легочных инфекций понижает риск возникновения бактериальных штаммов повышенной вирулентности и патогенности при длительном применении.

Журн. микробиол., 2016, № 5, С. 3—11

**Ключевые слова:** бактериофаги, фаготерапия, *Pseudomonas aeruginosa*, патогенность, лекарственная устойчивость, генетические взаимодействия, генетический перенос

Е.А.Плетенева<sup>1</sup>, О.В.Шабурова<sup>1</sup>, М.В.Буркальцева<sup>1</sup>, С.В.Крылов<sup>1</sup>,  
 А.М.Каплан<sup>1</sup>, Е.Н.Чеснокова<sup>1</sup>, О.А.Полыгач<sup>1,2</sup>, Н.Н.Ворошилова<sup>2</sup>,  
 Н.А.Михайлова<sup>1</sup>, В.В.Зверев<sup>1</sup>, В.Н.Крылов<sup>1</sup>

## NOVEL APPROACH TO COMPOSITION OF BACTERIOPHAGE MIXTURES FOR ANTIBACTERIAL THERAPY

<sup>1</sup>Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow; <sup>2</sup>Branch of SPO «Microgen», Ufa, Russia

**Aim.** Evaluate antibacterial activity of an experimental mixture of phages, belonging to several well-studied species. **Materials and methods.** The study was carried out using a group of 55 clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains of various origins, 4 mono-species mixtures of 32 virulent bacteriophages (species phiKZ-, phiKMV-, phiPB1-, PaP3-like phages) and 2 novel phages, phiMK (species PaK-P2) and phiPerm5. Activity of preparations from mono-species mixtures of

bacteriophages of various species were compared with activity of 3 commercial mixtures. Standard methods of study of bacteriophages were used: determination of lytic activity by seeding onto bacterial lawns of *P. aeruginosa*, restriction analysis of phage DNA for confirmation of their belonging to certain species. **Results.** Cumulative activity of 6 mono-species mixtures of virulent phages was shown to be similar to lytic activity of commercial therapeutic mixtures used against *P. aeruginosa* infections. 54 of 55 strains of clinical isolates of *P. aeruginosa* showed sensitivity to experimental mixtures composed of mono-species mixtures of bacteriophages. 53 strains were lysed by commercial preparations. Wherein the possibility of accidental inclusion of moderate bacteriophages in the experimental mixture is excluded. **Conclusion.** A possibility of creation of highly active therapeutic antibacterial preparations against *P. aeruginosa* using mono-species mixtures of 6 species of lytic bacteriophages is shown. Use of such a mixture in therapy of lung infections reduces the risk of emergence of bacterial strains with increased virulence and pathogenicity during prolonged administration.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 5, P. 3—11

Key words: bacteriophages, phage-therapy, *Pseudomonas aeruginosa*, pathogenicity, drug resistance, genetic interactions, genetic transfer

## ВВЕДЕНИЕ

Возникновение множественно устойчивых к антибиотикам патогенных бактерий возродило интерес к использованию бактериофагов. В России, Грузии и Польше фаготерапия успешно используется в лечении ряда заболеваний, в том числе раневых и урологических инфекций, инфекций верхних дыхательных путей, кишечника [5]. Часто причиной таких инфекций являются *Pseudomonas aeruginosa*. Особое значение однако имеет хроническая псевдомонадная инфекция легких у больных муковисцидозом (МВ). На фоне постоянного использования разных антибиотиков в специализированных клиниках возникли высоковирулентные штаммы *P. aeruginosa*, проявляющие не только множественную лекарственную устойчивость, но и способность к эпидемическому распространению и инфицированию здоровых людей [7, 10].

Единственным антибиотиком, к которому пока чувствительны большинство клинических изолятов *P. aeruginosa*, является колистин. С введением в лечение МВ так называемой агрессивной терапии и ингаляций колистина [4] связаны надежды на возможность увеличения продолжительности жизни больных МВ. Однако из-за высокой токсичности препарат не используют у детей до достижения шестилетнего возраста. Кроме того, к колистину также возникают устойчивые штаммы при мутациях в бактериальных генах [8, 12].

Недавно обнаружена трансмиссибельная плаزمида, кодирующая устойчивость к колистину [13]. Распространение таких плазмид в центрах по лечению МВ может иметь, очевидно, очень серьезные последствия. Возможно, что в этом случае применение специфических бактериофагов могло бы принести пользу в качестве единственно возможной антибактериальной терапии.

Несколько предприятий в России производят терапевтические фаговые препараты, в том числе активные при инфекциях, вызванных *P. aeruginosa*, но их нельзя применять для эрадикации *P. aeruginosa* при МВ по двум основным причинам. Используемый в настоящее время метод повышения активности терапевтических фаговых смесей, основанный на случайном обогащении любыми фагами из природных источников (сточная вода и др.), не исключает попадания в препарат умеренных бактериофагов, в том числе и тех видов, участие которых в эволюции *P. aeruginosa* привело к возникновению опасных эпидемических вариантов [16]. В ходе фаготерапии неизбежно возникают

фагоустойчивые мутанты бактерий, которые при кратковременном лечении не успевают накопиться до критического уровня. Однако поскольку при МВ антибактериальное лечение должно проводиться непрерывно, возникновение фагоустойчивости к определенной композиции бактериофагов приводит к необходимости быстрого приготвления новых активных фаговых препаратов с измененным спектром литической активности для каждого пациента.

Мы предлагаем другой подход к созданию терапевтических смесей фагов и к расширению их литической активности, который позволит использовать фаготерапию при МВ.

Базовую терапевтическую смесь (БТС) предлагается составлять из нескольких смесей фагов, каждая из которых содержит разные фаги одного вида с доказанной неспособностью стабильной лизогенизации бактерий. Каждая такая моновидовая композиция должна содержать фаги с разными спектрами литической активности. При этом на начальной стадии работы необходимо использовать прежде всего те виды, которые легко распознать по видимым признакам негативных колоний на газоне чувствительных бактерий. Это обеспечит в условиях реальной терапии быструю селекцию фагов известных видов (или их мутантов и рекомбинантов) с расширенным спектром литической активности.

В работе проведена оценка антибактериальной активности экспериментальной смеси из фагов, отнесенных к нескольким хорошо изученным видам. Рассматриваются проблемы, которые могут возникать при длительной фаготерапии как следствие взаимодействия фагов разных видов, и обсуждаются возможные способы их преодоления.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения большинства бактериофагов в высокой концентрации использовали бактерии стандартного лабораторного штамма *P. aeruginosa* PAO1. Фаги вида PaP3 ( $\phi$ iTL и  $\phi$ iCHU), плохо растущие на штамме PAO1, размножали на варианте этих бактерий с плазмидой pmg53 [15]. Для сравнения активности фагов применяли 55 штаммов бактерий *P. aeruginosa* разного происхождения: 12 штаммов разных серогрупп из коллекции НИИВС им. И.И. Мечникова (группа А); 18 штаммов, выделенных при урологических инфекциях, получены от Т.С. Перепановой (НИИ урологии) (группа В); 25 штаммов выделены от больных муковисцидозом, получены от M. Vanechoutte, University of Ghent, Бельгия и С. Pourcel, Université Paris-Sud, Orsay, Франция (группа С).

В моновидовую смесь  $\phi$ iKZ-подобных фагов включено 14 фагов, для смеси фагов вида PB1 — 12 разных фагов, для смеси фагов вида  $\phi$ iKMV — 4, для вида PaP3 — 2 фага. Некоторые из экспериментальных бактериофагов видов  $\phi$ iKZ, PB1,  $\phi$ iKMV и фаги вида PaP3 ( $\phi$ iCHU и  $\phi$ iTL) впервые выделены в лаборатории генетики бактериофага из разных природных образцов, отобранных в России, Бельгии и Германии [1, 3, 14]. Бактериофаг  $\phi$ iMK, относящийся к виду PAK\_P2, был выделен из образца сточной воды в предгорье Килиманджаро (Танзания). Бактериофаг  $\phi$ iNFS вида KMV-подобных фагов отобран как мутант одного из фагов в коммерческом препарате [11]. Некоторые бактериофаги видов PB1,  $\phi$ iKZ и фаг  $\phi$ iPerm5 были выделены из терапевтических смесей фагов и классифицированы до вида в ходе настоящей работы с использованием ПЦР и рестрикционного анализа. Некоторые из фагов ( $\phi$ iNFS,  $\phi$ iPerm5), выделенные из коммерческих смесей, использовались после мутационной адаптации к росту на лабораторном штамме только в целях научного исследования.

Получение фага в высоком титре: чашки Петри с агаризованной средой LB (1% бактотриптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl, 1,5% агар в дистиллированной воде) заливали слоем полужидкого агара с добавлением бактерий штамма PAO1 и на поверхность наносили бактериофаг из единичной колонии фага (бляшки) стерильными бумажными полосками. После инкубации при температуре 37°C в течение 18 — 20 часов полужидкий слой агара, содержащий выросший фаг, снимали, ресуспендировали в физиологическом растворе (0,9% NaCl) и центрифугировали при 12 000 об/мин. К супернатанту с фагом добавляли хлороформ для стерилизации. Хранили суспензии фагов при 6°C.

Рост фагов на поверхности газонов разных бактерий-хозяев сравнивали нанесением с помощью аппликатора на подготовленный бактериальный газон суспензий фагов и последующей инкубацией при температуре 37°C в течение 18 — 20 часов. Исследование взаимодействий фагов и бактерий-хозяев и между фагами разных видов проводилось в тех же условиях.

Подготовка образцов фагов описана выше. В ряде случаев очистка и концентрирование фагов проводились центрифугированием фаговых суспензий в градиенте плотности CsCl (Ultramicro centrifuge Hitachi, Япония, swing rotor S52ST, 25000g) с последующим диализом против фагового буфера TM (10 mM трисHCl, pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM NaCl). Выделение ДНК проводили фенольным методом, переваривание ДНК — эндонуклеазами EcoRV и HindIII (Fermentas) в соответствии с прилагаемыми инструкциями, электрофорез в агарозном геле — по Sambrook J. et al. ПЦР анализ ДНК фагов вида PB1 проводили на амплификаторе BIOER Gene Q Thermal Cycler с использованием праймеров фирмы «ЕвроГен».

Моновидовые смеси составляли из равных объемов концентрированных (10<sup>10-11</sup> б.о.е./мл) суспензий фагов данного вида и размножали высевом двуслойным методом на чашки Петри с газонами бактерий лабораторного штамма *P. aeruginosa* PAO1 или для фагов вида PaP3 — его варианта с плазмидой pMG53.

Активность смеси фагов оценивали нанесением капель смеси с помощью игольчатого репликатора на газоны в чашках Петри 55 клинических штаммов разного происхождения. Положительным результатом считали появление явного пятна лизиса после ночной инкубации.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Эффективность препаратов бактериофагов при длительном применении во многом зависит от возможности быстрого пополнения его состава безопасными литическими фагами, преодолевающими возникающую фагоустойчивость бактерий. Поиск и отбор новых фагов хорошо изученных видов может осуществляться на основании признаков, общих для представителей данного вида. На рис. 1 показан рост негативных колоний фагов выбранных нами видов после одного дня инкубации на газоне *P. aeruginosa* PAO1.

Для phiKZ-подобных фагов характерным признаком являются маленький размер бляшек (до 1мм) и специфическая опалесценция роста на газоне бактерий вследствие накопления большого количества фаговых частиц [2]. Присутствие фагов вида phiKZ во всех изученных коммерческих препаратах подтверждает широкий спектр их литической активности, в том числе, по видимому, и вследствие значительной независимости от бактериальной системы транскрипции [6]. Однако узкий интервал изменчивости среди фагов этого вида по признаку круга хозяев и способность фагов дикого типа к псев-

долизогенизации бактериальных клеток при множественной инфекции вызывают проблемы, которые можно решить направленным поиском мутантов с расширенным литическим спектром и сниженной способностью к псевдолизогении. Применение  $\phi$ KZ-подобных фагов в смеси с фагами других видов может компенсировать эти недостатки.

Второй вид, фаги которого визуально распознаются — вид KMV-подобных фагов. Для фагов этого вида, также обнаруженных в разных коммерческих препаратах, характерны крупные (от 0,5 см и более) негативные колонии, размер которых увеличивается при росте на стареющих бактериальных газонах в течение нескольких дней (в отличие от фагов остальных видов). Фаги этого вида способны вызывать псевдолизогенизацию бактериальных клеток при развитии на стареющем газоне во время фазы замедления клеточного деления [11].

Третий вид, также часто обнаруживаемый в составе коммерческих фаговых смесей и распознаваемый визуально по морфологии бляшек на бактериальном газоне, PB1-подобные фаги. Вокруг негативных колоний фагов вида PB1 после остановки роста формируется характерный плотный валик из псевдолизогенных бактерий-хозяев. Для этих фагов характерны высокая литическая активность (быстрый лизис), низкая частота возникновения устойчивых бактериальных мутантов). При совместной инфекции могут возникать рекомбинанты с измененным литическим спектром. Так, в данной работе после однократного пассажа моновидовой смеси из 12 разных PB1-подобных фагов на *P. aeruginosa* PAO1 возникли гибридные фаги с новыми спектрами литической активности.

Четвертая моновидовая смесь, использованная в работе, пока содержит только два новых фага вида PaP3-подобных фагов —  $\phi$ CHU и  $\phi$ TL, выделенных в нашей лаборатории из природных источников. Их геномы секвенированы [15]. Фаги этого вида постоянно встречаются в коммерческих препаратах, поскольку обладают широким спектром литической активности, в том числе и в отношении многих мукоидных штаммов *P. aeruginosa*, устойчивых к антибиотикам. Особенность фагов этого вида — образование мутных, почти неразличимых негативных колоний на штамме *P. aeruginosa* PAO1. Однако на газоне штамма PAO1 с плазмидой pMG53 (группа IncP2) происходило улучшение роста этих фагов с образованием различных по морфологии вариантов бляшек [11].

Еще два вида фагов — представленные фагами  $\phi$ MK вида PaK-P2 и новым фагом  $\phi$ Perm5, выбраны в качестве исходных для составления моноспецифических смесей, поскольку они были способны лизировать некоторые штаммы клинических изолятов, устойчивые к фагам других выбранных видов. На газоне *P. aeruginosa* PAO1 фаг  $\phi$ MK образовывал прозрачные крупные (5 — 7 мм) негативные колонии. Для фага Perm5 характерно образование с высокой частотой более прозрачных мутантов — обозначены как Perm5 clear (один из таких мутантов был использован в дальнейшей работе).

Подтвердить правильность визуального отнесения фага к определенному

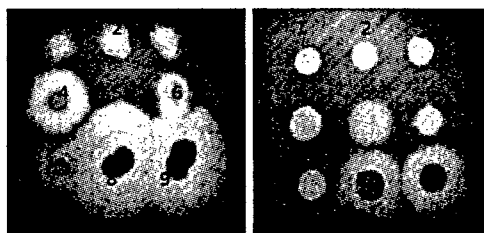


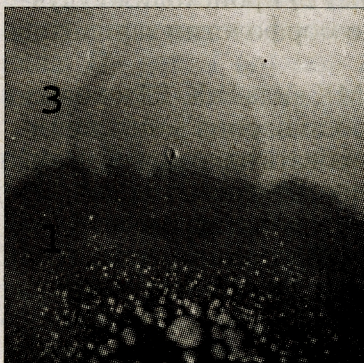
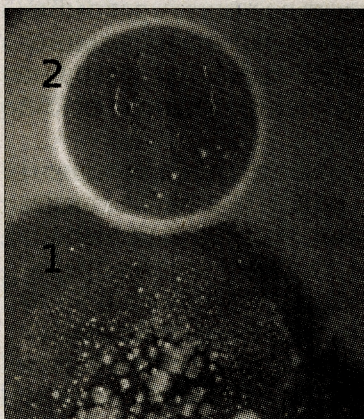
Рис. 1. Рост фагов разных видов на газонах *P. aeruginosa* PAO1 (слева) и *P. aeruginosa* Pu21 (PMG53) (справа). 1 —  $\phi$ KZ; 2 — EL vir10; 3 — Lin68; 4 —  $\phi$ MK; 5 — TL; 6 — PB1; 7 —  $\phi$ Perm5; 8 — FMV; 9 —  $\phi$ NFS.



виду можно по результатам ПЦР, рестрикционного анализа ДНК или экспресс-секвенирования. Сравнение рестрикционных профилей ДНК отдельных фагов и приготовленных из них моновидовых смесей позволяет легко обнаружить общие для геномов разных фагов данного вида консервативные участки генома.

Определение литической активности фагов, включенных в состав моновидовых смесей, показало, что 52 из 55 включенных в работу штаммов *P. aeruginosa* проявили чувствительность к лизису смесью, составленной из 32 бактериофагов шести видов (табл.). Один из штаммов оказался устойчив к смеси всех фагов. Еще два штамма проявили чувствительность к двум разным фагам, phiMK и phiPerm5. Фаг phiMK отнесен к виду PaK-P2, а фаг phiPerm5 — к группе N4-подобных фагов (на основании данных секвенирования и аннотации, личное сообщение D. Magill и L. Kulakov, Северная Ирландия).

Три разных коммерческих смеси фагов лизировали 52 штамма из 55 использованных в работе. Таким образом, явных различий в литической активности суммарной смеси, составленной из разных моновидовых смесей и коммерческих препаратов, не обнаружено. Полученные результаты позволяют сделать предположение, что эффективность смесей изученных фагов в фаготерапии будет достаточно высокой.



**Сравнение активности 6 моновидовых смесей на 55 штаммах разного происхождения**

Группы изолятов	KMV-like	PB1-like	phiKZ-like	PaP3-like	phiMK	phiPerm5
A	8	10	8	4	7	3
B	9	10	15	9	3	6
C	14	17	12	2	11	12

Примечание. Группы изолятов см. «Материалы и методы».

**Рис. 2. Взаимодействие бактериофагов в биопленке (газоне) *P. aeruginosa* PAO1.**

Вверху — при перекрытии зон лизиса фагов видов KMV и PB1 бактерии, устойчивые к PB1, не поддерживают развития KMV-подобного фага phiNFS. Внизу — в области пересечения зон лизиса phiNFS и phiPerm5 происходит взаимодействие, при котором значительная часть бактерий, устойчивых к phiPerm5, лизируется фагом phiNFS. Возраст биопленки 72 часа. Зона лизиса KMV-подобного фага phiNFS (1) продолжает увеличиваться, а зоны лизиса фагов PB1 (2) и phiPerm5 (3) полностью сформированы.

Бактерии *P. aeruginosa* обычно образуют биопленки на пораженных поверхностях органов или в ране. Моделью биопленки может служить рост бактерий в тонком верхнем слое полужидкого агара. При этом удается наблюдать уникальные взаимодействия между бактериофагами разных видов, включенными в терапевтическую смесь, и оценить возможное влияние на лечебный эффект. На рис. 2 показаны примеры таких взаимодействий на газоне *P. aeruginosa* PAO1. Можно видеть, что рост бляшек фагов вида phiKMV, проявляющих наиболее выраженный и долго-

временный литический эффект, подавляется при контакте с зоной роста фагов других видов. Такое взаимодействие может отрицательно повлиять на антибактериальную эффективность при терапии, но его можно минимизировать подбором оптимальных концентраций разных фагов в исходной базовой терапевтической смеси.

При посеве на газоны разных клинических изолятов выявлены особенности взаимодействия фагов вида *phiKMV* с некоторыми штаммами бактерий. На поверхности газона клинического изолята *P. aeruginosa* UR14 образовывались крупные плаки. При инфекции этих бактерий фагом *phiNFS* (вид *KMV*-подобных) происходило изменение характера роста бактерий в зоне, прилегающей к месту нанесения фага. В непосредственной близости от зоны лизиса бактериальные плаки отсутствовали, а в остальной части они имели существенно меньший размер (рис. 3). Причиной уменьшения размера плаков в

этой области является ее состав — кроме присутствия неизменных бактерий штамма UR14, в ней были обнаружены мутанты этих бактерий, у которых плакирование существенно подавлено, что и приводит к уменьшению размера плаков. Следует отметить, что область выраженного подавления плакообразования имеет четкую границу, и это может быть связано с сигнальной активностью диффундирующих из пятна лизиса продуктов.

Фаги видов *phiKZ*- и *KMV*-подобных являются постоянными компонентами коммерческих терапевтических смесей, что подтверждает широту спектра литической активности и обязательность их использования в виде моновидовых наборов для включения в БТС. В то же время, для этих фагов описана способность вызывать у инфицированных бактерий состояние псевдолизогении [2, 11]. По-видимому, недостаточная терапевтическая эффективность фагов *phiKZ* и *phiKMV*, использованных индивидуально в модельных опытах на животных [9], объясняется именно возникновением псевдолизогенов. В то же время, псевдолизогены по фагам этих видов лизируются при перекрестной инфекции, а также при инфекции фагами других видов. Таким образом, эффект псевдолизогении при совместном использовании фагов этих видов не понизит эффективности терапевтической смеси фагов. Кроме того, в случае *phiKZ*-подобных фагов можно отобрать мутанты, лизирующие бактерии в псевдолизогенном состоянии [2]. Пока отбор таких мутантов достаточно трудоемкий, но можно ожидать, что после локализации области в геноме фага, контролирующей этот признак, создание таких вирулентных мутантов окажется достаточно простым и быстрым процессом.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Возникновение множественно устойчивых к антибиотикам штаммов *P. aeruginosa* осложняет лечение инфекции легких у больных муковисцидозом.

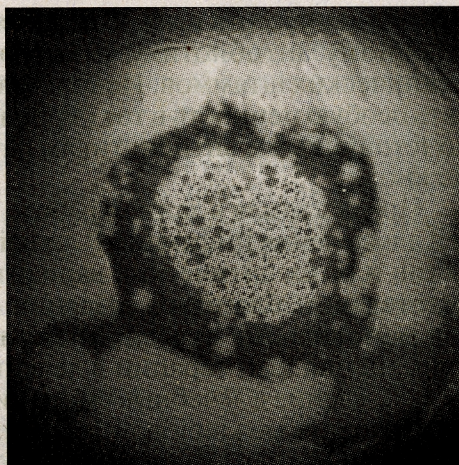


Рис. 3. Рост фага *phiNFS* вида *KMV*-подобных на газоне плакирующего штамма *P. aeruginosa* UR14.

Вокруг зоны лизиса изменяется (усиливается) рост бактерий. В непосредственной близости от зоны лизиса бактериальные плаки отсутствуют, а в остальной части они имеют существенно меньший размер.

Возрастает частота штаммов, проявляющих устойчивость к колистину, единственному антибиотику, к которому все еще чувствительно большинство клинических штаммов. Использование фаготерапии при МВ может представлять особую ценность в тот период, когда пациент инфицирован множественно устойчивым к антибиотикам патогеном, а использование колистина невозможно.

Предлагаемая в данной работе модификация приготовления фаговых смесей для лечения инфекций *P. aeruginosa* исключает попадание в них умеренных фагов или их литических вариантов и способна обеспечить непрерывность фаготерапии, благодаря созданию и постоянному расширению наборов фагов для моновидовых смесей. Мы считаем, что оба эти условия обязательны для применения фаготерапии в лечении инфекции *P. aeruginosa* при муковисцидозе. Введение в лечебные смеси вирулентных фагов хорошо изученных видов, не имеющих межвидовой гомологии ДНК, исключает возникновение «мозаиков» и «химер» как в результате рекомбинации фагов, так и при рекомбинации геномов фагов с бактериальными геномами. Отбор новых фагов выбранных видов следует вести на постоянной основе, заранее создавая резервные коллекции для каждого из видов фагов. Их при необходимости можно использовать для расширения литического спектра БТС.

Предполагается, что применение БТС и предлагаемых моновидовых смесей фагов для лечения инфекции *P. aeruginosa* при МВ потребует обязательной персональной адаптации состава для каждого пациента. Эта дополнительная работа может проводиться персоналом медицинского учреждения с использованием коллекций фагов, созданных в научных или/и производственных лабораториях.

Разумеется, при необходимости спектр литической активности БТС может быть расширен добавлением к ней моновидовых смесей фагов других видов (после доказательства их литической природы).

Проведенное ранее изучение результатов ингаляции персонально приготовленных фаговых смесей у больных муковисцидозом подтвердило принципиальную возможность элиминации инфицирующих бактерий [Shabalova I.A. et al., 1995]. Очевидно, что обнаружение сложных отношений фагов вида РВ1 и бактерий разных видов [Malki A. et al., 2015] требует дальнейшего изучения разнообразия взаимодействия фагов и бактерий для исключения возможности межвидовой трансдукции в ходе терапии.

*Авторы выражают благодарность за предоставление фагов и клинических изолятов P.aeruginosa Т.С.Перепановой (Москва), М.Vaneechoutte (Бельгия), С.Pourcel (Франция) и Н-W.Ackermann (Канада).*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Плетенева Е.А., Буркальцева М.В., Шабурова О.В., Крылов С.В., Печникова Е.В., Соколова О.С., Крылов В.Н. Новый бактериофаг TL *Pseudomonas aeruginosa* и его использование для поиска фагов, образующих ореолы. Генетика. 2011, 47 (1): 5-9.
2. Плетенева Е.А., Крылов С.В., Шабурова О.В., Буркальцева М.В., Мирошников К.А. Крылов В.Н. Псевдолизогения бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, инфицированных  $\rho$ hiKZ-подобными бактериофагами. Генетика. 2010, 46 (1): 26-32.
3. Плетенева Е.А., Шабурова О.В., Сыкилинда Н.Н., Мирошников К.А., Кадыков В.А., Крылов С.В., Месянжинов В.В., Крылов В.Н. Изучение разнообразия в группе фагов вида РВ1 (Myoviridae) *Pseudomonas aeruginosa* и их поведения на адсорбционно-устойчивых мутантах бактерий. Генетика. 2008, 44 (2): 185-194.
4. Barry P.J., Jones A.M. New and emerging treatments for cystic fibrosis. *Drugs*. 2015, 75(11): 1165-75. doi: 10.1007/s40265-015-0424-8.
5. Chanishvili N. Phage therapy — history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches. *Adv. Virus. Res.* 2012, 83: 3-40.

6. Ceyskens P.J., Minakhin L., Van den Bossche A. et al. Development of giant bacteriophage  $\phi$ KZ is independent of the host transcription apparatus. *J Virol.* 2014, 88 (18): 10501-10510.
7. Fothergill J.L., Walshaw M.J.; Winstanley C. Transmissible strains of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infections. *Eur. Resp. J.* 2012, 40: 227-238.
8. Fernández L., Gooderham W.J., Bains M. et al. Adaptive resistance to the «last hope» antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010, 54 (8): 3372-3382.
9. Henry M., Lavigne R., Debarbieux L. Predicting in vivo efficacy of therapeutic bacteriophages used to treat pulmonary infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013, 57 (12): 5961-5968.
10. James C.E., Fothergill J.L., Kalwij H. et al. Differential infection properties of three inducible prophages from an epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol.* 2012, 21 (12): 216. doi: 10.1186/1471-2180-12-21.
11. Krylov V., Shaburova O., Pleteneva E. et al. Selection of phages and conditions for the safe phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Viol. Sin.* 2015, 30 (1): 33-44.
12. Lee J.Y., Chung E.S., Na I.Y. et al. Development of colistin resistance in pmrA-, phoP-, parR- and cprR-inactivated mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2014, Jul 2. pii: dku238.
13. Liu Y.Y., Wang Y., Walsh T.R. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect. Dis.* 2015, Nov 18. pii: S1473-3099(15)00424-7. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7.
14. Lavigne R., Burkaltseva M.V., Robben J. et al. The genome of bacteriophage phiKMV, a T7-like virus infecting *Pseudomonas aeruginosa*. *Virology.* 2003, 312 (1): 49-59.
15. Magill D.J., Shaburova O.V., Chesnokova E.N. et al. Complete nucleotide sequence of phiCHU: a Luz24likevirus infecting *Pseudomonas aeruginosa* and displaying a unique host range. *FEMS Microbiol. Lett.* 2015, 362 (9). pii: fnv045. doi: 10.1093/femsle/fnv045. Epub. 2015 Mar 30.
16. Winstanley C., Langille M.G., Fothergill J.L. et al. Newly introduced genomic prophage islands are critical determinants of in vivo competitiveness in the Liverpool epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Res.* 2009, 19 (1): 12-23.

*Поступила 20.02.16*

Контактная информация: Крылов Виктор Николаевич,  
105064, Москва, пер. М.Казенный, 5А, р.т. (495)917-49-00

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*И.И.Долгушин<sup>1</sup>, Ю.С.Шишкова<sup>1</sup>, С.Н.Даровских<sup>2</sup>, И.А.Комарова<sup>1</sup>,  
Н.В.Вдовина<sup>2</sup>, Е.А.Мезенцева<sup>1</sup>, К.В.Никушкина<sup>1</sup>*

## **ОСОБЕННОСТИ МОДИФИЦИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ НИЗКОИНТЕНСИВНЫХ ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫХ ИЗЛУЧЕНИЙ ПРИРОДНОГО И ТЕХНОГЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ СТАТУС НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ**

<sup>1</sup>Южно-Уральский государственный медицинский университет, <sup>2</sup>Южно-Уральский государственный университет, Челябинск

*Цель.* Изучить in vitro действие микроволновых электромагнитных излучений (ЭМИ) СВЧ диапазона на жизнеспособность и функциональный статус нейтрофильных гранулоцитов. *Материалы и методы.* Нейтрофилы периферической крови 30 условно здоровых доноров в возрасте 18 — 20 лет подвергали воздействию широкополосного (природного, аналогичного радиоизлучению Солнца) и моночастотного (техногенного, аналогичного излучению сотовых телефонов, компьютеров, микроволновых печей и др.) ЭМИ в диапазоне частот 4 — 4,34 ГГц, генерированных СВЧ-генератором «АИМТ-1». После 16 мин воздействия изучалась жизнеспособность нейтрофильных гранулоцитов, фагоцитарная функция, лизосомальная активность клеток, оценивалась НСТ-восстанавливающая спо-

способность и содержание цитокинов в супернатантах. *Результаты.* После воздействия на нейтрофилы моделированным ЭМИ с техногенной частотно-временной структурой количество жизнеспособных нейтрофилов значительно снижалось, функциональный статус жизнеспособных клеток не изменялся. После воздействия ЭМИ природного происхождения нейтрофилы сохраняли свою жизнеспособность, в супернатантах определялся повышенный уровень ИЛ1 $\beta$  и ФНО $\alpha$ , функциональный статус нейтрофилов мужчин оставался стабильным, а у женщин было отмечено усиление фагоцитарной способности и снижение продукции кислородных радикалов. *Заключение.* Выявленное снижение количества жизнеспособных нейтрофилов при воздействии ЭМИ техногенного происхождения может привести к нарушениям в системе врожденного иммунитета, других звеньев гомеостаза организма человека и развитию патологических состояний. В то же время, обнаруженные эффекты ЭМИ природного происхождения открывают перспективы использования моделированного микроволнового ЭМИ СВЧ диапазона в профилактической и клинической медицине.

Журн. микробиол., 2016, № 5, С. 11–17

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, электромагнитное излучение, врожденный иммунный ответ

*I.I. Dolgushin<sup>1</sup>, Yu.S. Shishkova<sup>1</sup>, S.N. Darovskikh<sup>2</sup>, I.A. Komarova<sup>1</sup>, N.V. Vdovina<sup>2</sup>, E.A. Mezentseva<sup>1</sup>, K.V. Nikushkina<sup>1</sup>*

## FEATURES OF MODIFYING EFFECT OF LOW-INTENSITY ELECTROMAGNETIC RADIATION OF NATURAL AND TECHNOGENIC ORIGIN ON VIABILITY AND FUNCTIONAL STATUS OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES

<sup>1</sup>South-Urals State Medical University, <sup>2</sup>South-Urals State University, Chelyabinsk, Russia

*Aim.* Study effects of microwave electromagnetic radiation (EMR) of the SHF range *in vitro* on viability and functional status of neutrophilic granulocytes. *Materials and methods.* Neutrophils of peripheral blood of 30 conditionally healthy donors aged 18 — 20 years were exposed to the effect of broadband (natural, similar to sun radio emission) and mono-frequency (technogenic, similar to emission of cell phones, PCs, microwave ovens, etc.) EMR with frequency range of 4 — 4.34 GHz, generated by a SHF-generator «AIMT-1». 16 minutes after the effect, viability of neutrophilic granulocytes, phagocytic activity, lysosome activity of cells were studied, NBT-reducing ability and cytokine content in supernatant were evaluated. *Results.* The amount of viable neutrophils significantly reduced after the effect of modelled EMR with technogenic frequency-temporal structure, functional status of viable cells did not change. Neutrophils retained viability after the effect of EMR of natural origin, increased levels of IL1 $\beta$  and TNF $\alpha$  was determined in supernatants, functional status of neutrophils of men remained stable, and in women an increase of phagocytic ability and a reduction of production of oxygen radicals was noted. *Conclusion.* The detected reduction of the amount of viable neutrophils under the effect of EMR of technogenic origin could result in disturbances in the system of innate immunity, other homeostasis elements of the human organism and development of pathologic conditions. At the same time, the detected effects of EMR of natural origin open perspectives of use of modelled microwave EMR of SHF range in prophylaxis and clinical medicine.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 5, P. 11–17

Key words: neutrophilic granulocytes, electromagnetic radiation, innate immune response

## ВВЕДЕНИЕ

Нейтрофилы традиционно относятся к фагоцитирующим клеткам, которые благодаря ряду уникальных свойств (высокой подвижности, способности легко передвигаться в тканях, наличию мощных бактерицидных и цитотоксических продуктов) рассматриваются как высокопрофессиональные «убий-

цы», составляющие своеобразный «отряд быстрого реагирования в системе врожденной противомикробной защиты организма» [Долгушин И.И., Шишкова Ю.С., Савочкина А.Ю., 2011]. Уже более ста лет изучаются их морфология и функции. Были проведены фундаментальные исследования тонкого строения, физиологии нейтрофилов, биохимического состава их гранул, расшифрованы структуры их метаболитов. Установлено, что помимо бактерицидных факторов в нейтрофилах присутствуют и синтезируются в процессе активации вещества с разнообразными регуляторными свойствами (простагландины, лейкотриены, ферменты, низко- и среднемолекулярные пептиды и др.), с помощью которых гранулоциты могут влиять на функции макрофагов, лимфоцитов, эозинофилов, эпителиоцитов, фибробластов, на секрецию иммуноглобулинов, систему комплемента, фибринолиз и другие системы [1, 5]. Наиболее изучены у нейтрофилов антимикробные реакции. Свой бактерицидный внутри- и внеклеточный эффект они осуществляют как путем фагоцитоза, так и с помощью секреции компонентов своих гранул и ДНК в окружающую среду, осуществляя противомикробную защиту и участвуя в регуляции формирования микробиоценозов слизистых оболочек [3, 6]. На основании проведенных исследований была сформулирована концепция о роли нейтрофилов в поддержании гомеостаза организма человека в условиях окружающей среды [4].

Необходимо отметить, что за последние десятилетия произошли существенные изменения свойств окружающей среды. Некоторые из них являются необратимыми. В первую очередь, это касается природного электромагнитного фона, обусловленного космическими и геофизическими факторами. В настоящее время этот фон полностью подавлен электромагнитными полями и излучениями техногенного происхождения, создаваемыми электростанциями, линиями электропередач, железнодорожным и городским транспортом, телевизионными передатчиками, базовыми станциями сотовой радиосвязи, радиопередающими центрами связи и навигации, средствами мобильной и сотовой связи, радиолокационными станциями, медицинским оборудованием и т.п. Излучения техногенного происхождения рассматриваются специалистами как существенный фактор дестабилизации поддержания организмами своего гомеостаза [2].

Несмотря на большой объем проведенных исследований по определению влияния различных факторов на функционирование нейтрофилов малоизученной остается оценка их взаимодействия с ЭМИ различного происхождения. В этой связи, было исследовано модифицирующее действие моделированных электромагнитных излучений природного и техногенного происхождения на жизнеспособность и показатели функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов периферической крови человека.

Цель настоящего исследования — изучить *in vitro* действие моделированных низкоинтенсивных микроволновых электромагнитных излучений, аналогичных природному и техногенному, на жизнеспособность, НСТ-восстанавливающую, фагоцитарную функции и лизосомальную активность нейтрофильных гранулоцитов, а также их способность к формированию нейтрофильных внеклеточных ловушек, продукцию провоспалительных цитокинов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве источника ЭМИ был использован СВЧ-генератор (диапазон частот 4 — 4,34 ГГц) «АИМТ-1» с рупорным излучателем. Моделирование в указанном диапазоне частот микроволнового «всплеска» радиоизлучения

Солнца осуществляли изменением режима генерации широкополосного электромагнитного излучения, при котором в течение 8 мин осуществлялось излучение с возрастанием его интенсивности от 50 до 500 мкВт/см<sup>2</sup>, а в последующие 8 мин использовался режим излучения, при котором указанные параметры интенсивности излучения изменялись в обратном порядке. Таким образом, общая продолжительность воздействия в каждом эксперименте составляла 16 мин и соответствовала одному моделированному микроволновому «всплеску» Солнца той же длительности в диапазоне частот 4 — 4,34 ГГц.

Для моделирования техногенного ЭМИ использовалось моночастотное излучение на частоте  $f_0 = 4,13$  ГГц с интенсивностью излучения 500 мкВт/см<sup>2</sup>. Общая продолжительность излучения в каждом эксперименте составляла также 16 мин.

Объектом воздействия электромагнитного излучения явились нейтрофилы периферической крови 30 условно здоровых доноров в возрасте 18 — 20 лет, у которых были исключены ОРВИ, тяжелая соматическая патология, воспалительные процессы бактериальной природы различных локализаций в стадии обострения, туберкулез, гепатит и ВИЧ-инфекция.

Жизнеспособность и функциональная активность нейтрофильных гранулоцитов изучалась в цельной периферической крови 21 донора *in vitro*, которая сразу после взятия была разделена на 3 части. На одну часть клеток воздействовали ЭМИ природного происхождения на расстоянии 15 см от источника, вторую подвергали воздействию ЭМИ техногенного происхождения также на расстоянии 15 см от источника, а третью оставляли без воздействия в течение 16 минут (контроль). Для определения жизнеспособности, люминесценции лизосом и определения нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) периферическую кровь смешивали с 0,05 мл раствора акридинового оранжевого в концентрации 2 мкг/мл. После 30 мин инкубации при температуре +37°C клетки помещали на предметное стекло, накрывали покровным стеклом и под иммерсией исследовали в потоке сине-фиолетового света люминесцентного микроскопа «Люам». При таком способе окраски ядра жизнеспособных нейтрофилов окрашивались в ярко-зеленый цвет, внеклеточные ловушки были представлены тонкими ярко-зелеными нитями, занимающими пространство, в 2 — 3 раза превосходящее диаметр неизмененного нейтрофила, лизосомальные гранулы были ярко-оранжевого цвета. Рассчитывали процент жизнеспособных нейтрофилов и процент сформированных НВЛ, определяли лизосомальную активность как число нейтрофилов, имеющих лизосомальные гранулы. Для оценки кислородзависимого метаболизма нейтрофилов постановку НСТ-теста осуществляли в модификации А.Н.Маянского и М.К.Виксмана. При учете реакции определяли процент НСТ-позитивных клеток и учитывали интенсивность реакции. Изучение способности нейтрофилов к фагоцитозу проводили по методу И.С.Фрейдлин (1984). При анализе фагоцитоза рассчитывали процент фагоцитов (активность фагоцитоза) и число поглощенных объектов в 100 подсчитанных нейтрофилах (интенсивность фагоцитоза) [3].

Для оценки содержания провоспалительных цитокинов в супернатантах нейтрофилов чистую фракцию гранулоцитов выделяли из 15 мл гепаринизированной (10 — 15 ЕД/мл гепарина фирмы «Гедеон-Рихтер», Венгрия) периферической венозной крови 30 доноров. С целью осаждения эритроцитов кровь отстаивали в стерильной пробирке с добавлением 10% раствора желатина в соотношении 10:1 при температуре +37°C в течение 30 минут. Нейтрофилы выделяли из лейкоцитарной взвеси на двойном градиенте плот-

Таблица 1. Жизнеспособность, фагоцитарная функция и лизосомальная активность нейтрофильных гранулоцитов после воздействия низкоинтенсивным СВЧ электромагнитным излучением

Показатели жизнеспособности, фагоцитарной функции и лизосомальной активности	Пол донора	ЭМИ природного происхождения	ЭМИ техногенного происхождения	Контроль
Содержание жизнеспособных нейтрофилов, %	Муж. (n=10)	89,8±10,06 p <sub>1-2</sub> = 0,024	70,0±13,0 p <sub>2-к</sub> = 0,014	91,61±10,92
	Жен. (n=11)	88,7±22,44	76,9±14,0 p <sub>2-к</sub> = 0,039	89,2±9,69
Внеклеточные ловушки, %	n=10	0,42±0,42	11,2±7,03	0,94±0,94
Активность фагоцитоза, %	Муж. (n=10)	17,83±16,51	12,92±16,42	14,47±27,3
	Жен. (n=11)	16,67±8,22	15,38±11,06	17,07±11,21
Индекс фагоцитоза, усл. ед.	Муж. (n=10)	1,5±0,57	1,46±0,85	1,66±1,27
	Жен. (n=11)	2,0±0,55	1,73±1,28	1,29±0,63 p <sub>1-3</sub> = 0,039
Активность лизосом, %	Муж. (n=10)	92,5±4,62	90,0±9,23	92,0±10,49
	Жен. (n=11)	95,0±5,97	91,0±7,63	95,0±6,84

ности стерильных растворов фикола-урографина (Pharmacia, Швеция; Шеринг, Германия), доводили до концентрации  $5 \times 10^6$  кл./мл. Полученную взвесь клеток делили на 3 части. На одну часть клеток воздействовали ЭМИ природного происхождения, вторую — подвергали воздействию ЭМИ техногенного происхождения, а третью оставляли без воздействия (контроль). Затем путем центрифугирования получали супернатанты, в которых методом ИФА определяли концентрацию продуцируемых нейтрофилами цитокинов: ИЛ8, ИЛ18, ИЛ1 $\beta$ , ФНО $\alpha$  с помощью тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований установили, что в эксперименте *in vitro* после воздействия на нейтрофилы моделированным ЭМИ с техногенной частотно-временной структурой происходило значительное снижение количества жизнеспособных нейтрофилов периферической крови доноров вне зависимости от половой принадлежности последних (табл. 1). Природное ЭМИ не оказывало влияния на количество жизнеспособных нейтрофилов периферической крови доноров.

Фагоцитарная функция нейтрофилов изучалась на модели поглощения частиц полистирольного латекса. Представленные данные экспериментального исследования (табл. 1) наглядно демонстрируют, что после действия природных электромагнитных СВЧ излучений на нейтрофильные гранулоциты женщин происходит значительное увеличение количества захваченных латексных частиц. У мужчин фагоцитарная функция нейтрофильных гранулоцитов остается стабильной как при действии техногенного, так и при действии природного ЭМИ.

Для оценки лизосомального аппарата нейтрофилов и образования НВЛ проводили прижизненное окрашивание нейтрофилов акридиновым оранжевым. Представленные в табл. 1 результаты отражают стабильность показателей лизосомальной активности нейтрофилов, выделенных из периферической



Таблица 2. Показатели НСТ-теста нейтрофилов доноров при действии природного и антропогенного низкоинтенсивного СВЧ электромагнитного излучения

Показатели НСТ-теста		Пол донора	ЭМИ природного происхождения	ЭМИ техногенного происхождения	Контроль
Спонтанный	Активность, %	Муж. (n=10)	45,0±28,75	42,5±28,96	42,5±31,86
		Жен. (n=11)	52,38±25,09	35,0±26,89	52,38±25,72
	Индекс, усл. ед.	Муж. (n=10)	0,6±0,58	0,65±0,55	0,6±0,63
		Жен. (n=11)	0,8±0,51	0,45±0,41	0,67±0,53
Индукцированный	Активность, %	Муж. (n=10)	40,84±33,45	66,5±39,2	55,0±30,48
		Жен. (n=11)	50,0±29,77	50,0±29,64	78,85±13,27 p <sub>1-3</sub> = 0,039
	Индекс, усл. ед.	Муж. (n=10)	0,55±0,6	1,02±0,73	0,52±0,73
		Жен. (n=11)	0,9±0,49	0,63±0,52	1,15±0,39

крови доноров, при этом активность лизосом нейтрофилов не изменяется при действии ЭМИ как природного, так и техногенного происхождения. Изменений в количестве НВЛ как в группах с воздействием ЭМИ, так и в контрольной группе, также выявлено не было.

Оценку кислородзависимого метаболизма нейтрофилов после воздействия указанных ЭМИ проводили при использовании НСТ-теста в двух вариантах: спонтанный и индуцированный частицами полистирольного латекса.

НСТ-редуцирующая активность нейтрофилов мужчин не изменялась при действии как природного, так и техногенного низкоинтенсивного СВЧ электромагнитного излучения.

У женщин спонтанный НСТ-тест также не выявил изменений внутриклеточной продукции кислородных радикалов как при действии природного, так и техногенного низкоинтенсивного СВЧ электромагнитного излучения. Однако после воздействия ЭМИ, аналогичного природному, и активации клеток частицами латекса НСТ-редуцирующая способность нейтрофильных гранулоцитов была значительно ниже контрольных показателей (табл. 2).

Таким образом, нами обнаружено, что действие техногенных электромагнитных СВЧ излучений не влияет на кислородзависимый метаболизм нейтрофилов мужчин и женщин. Действие природных электромагнитных СВЧ излучений блокирует НСТ-реакцию активированных нейтрофилов у женщин, у мужчин этот показатель остается стабильным.

При определении цитокинов в супернатантах нейтрофильных гранулоцитов достоверных различий содержания ИЛ8 и ИЛ18 в

Таблица 3. Показатели уровня цитокинов в супернатантах нейтрофилов доноров при действии природного и техногенного низкоинтенсивного СВЧ электромагнитного излучения (пг/мл)

Уровень цитокинов в супернатантах нейтрофилов	ЭМИ природного происхождения (n = 30)	ЭМИ техногенного происхождения (n = 28)	Контроль (n = 30)
ИЛ8	3,10±8,07	3,19±9,68	4,05±4,99
ИЛ18	4,34±2,28	5,07±1,96	4,94±2,24
ИЛ1β	3,84±2,23	3,21±2,87	2,95±2,22 p <sub>1-3</sub> = 0,015
ФНОα	4,0±0,91	3,86±0,59	3,21±0,7 p <sub>1-3</sub> = 0,002 p <sub>2-3</sub> = 0,002

сравниваемых группах не выявлено. Уровень ИЛ1 $\beta$  и ФНО $\alpha$  в супернатантах нейтрофилов, подвергшихся воздействию природного ЭМИ микроволнового диапазона, был достоверно выше, чем в контрольных группах. После воздействия техногенным низкоинтенсивным ЭМИ было зарегистрировано повышение уровня ФНО $\alpha$  (табл. 3).

Таким образом, результаты проведенного исследования наглядно демонстрируют разные эффекты действия низкоинтенсивных электромагнитных излучений природного и техногенного происхождения на жизнеспособность и функциональный статус нейтрофильных гранулоцитов.

Итоги эксперимента свидетельствуют о выраженном влиянии техногенных ЭМИ на жизнеспособность нейтрофильных гранулоцитов мужчин и женщин. Техногенное ЭМИ может приводить к нарушению физиологических процессов организма человека, в которых нейтрофилы принимают участие: формирование колонизационной резистентности, противоопухолевая и антимикробная защита, регуляция системы гемостаза, изменение устойчивости к стрессовым факторам.

Действие моделированного природного ЭМИ иное: нейтрофилы сохраняют свою жизнеспособность и функциональный статус. При этом нами отмечено, что у женщин при действии природного ЭМИ повышается интенсивность фагоцитарной реакции гранулоцитов и снижается внутриклеточная продукция активных форм кислорода, отмечается повышение секреции нейтрофилами провоспалительных цитокинов ИЛ1 $\beta$  и ФНО $\alpha$ .

Таким образом, ЭМИ различного генеза неодинаково влияют на функциональный статус нейтрофилов. Эти результаты представляют несомненный интерес и требуют дальнейшего исследования.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бережная Н.М. Нейтрофилы и иммунологический гомеостаз. Киев, Наукова Думка, 1988.
2. Григорьев Ю.Г., Григорьев К.А. Электромагнитные поля базовых станций подвижной сотовой связи и экология. Оценка опасности электромагнитных полей базовых станций для населения и биосистем. Радиационная биология. Радиоэкология. 2005, 45 (4): 726-731.
3. Долгушин И.И., Андреева Ю.С. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: методы обнаружения и оценка эффективности улавливания бактерий. Журн. микробиол. 2009, 2: 65-67.
4. Долгушин И.И., Бухарин О.В. Нейтрофилы и гомеостаз. Екатеринбург, УрО РАН, 2001.
5. Маянский А.Н. Галиуллин А.Н. Реактивность нейтрофила. Казань, Изд-во Казан. унта, 1984.
6. Шишкова Ю.С. Роль нейтрофилов в формировании колонизационной резистентности слизистых оболочек. Дис. д-ра. мед. наук. Челябинск, 2010.

*Поступила 25.04.16*

Контактная информация: Комарова Ирина Андреевна,  
454092, Челябинск, ул. Воровского, 64, р.т. (351)232-73-71

С.А.Лужнова<sup>1</sup>, М.Ю.Юшин<sup>1</sup>, А.В.Воронков<sup>2</sup>,  
С.А.Осыченко<sup>2</sup>, Н.М.Габитова<sup>1</sup>, Е.А.Юртаева<sup>1</sup>

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНОГО 1,3-ДИАЗИНОНА-4 СОЕДИНЕНИЯ ПЯТd1 IN VIVO

<sup>1</sup>НИИ по изучению лепры, Астрахань; <sup>2</sup>Пятигорский медико-фармацевтический институт — филиал Волгоградского государственного медицинского университета

**Цель.** Исследовать противолепрозную активность производного 1,3-диазинона-4 соединения под лабораторным шифром ПЯТd1 на модели интраплантарного заражения мышей и оценить характер его антибактериального действия. **Материалы и методы.** Исследование специфической активности проводили *in vivo* на экспериментальной модели лепры, предложенной Shepard C.C., которая предполагает осуществление интраплантарного заражения мышей суспензией микобактерий, приготовленной из лепром или аутопсийной ткани нелеченного больного лепрой, или из тканей экспериментальных мышей, ранее зараженных *Mycobacterium leprae* от нелеченных больных. Исследование проведено на 120 мышах линии СВА, зараженных *M. leprae* (VIII пассаж) от больного М. Дапсон и соединение ПЯТd1 животным вводили на следующий день после заражения вместе с кормом в дозе 25 мг/кг в течение 4,5; 6; 9; 11 месяцев. Мышей делили на 3 группы: контроль (зараженные без лечения), сравнения (зараженные, получавшие дапсон), опытная (зараженные, получавшие ПЯТd1). По истечению контрольного срока мышей забивали под хлороформным наркозом. Из подушечек лап готовили суспензию для подсчета микобактерий. Мазки окрашивали по Цилю—Нильсону. **Результаты.** Через 4,5 мес. интенсивность размножения инфекта под действием дапсона и ПЯТd1 была снижена в сравнении с контролем в 18 — 25 раз. После 6-месячного курса — на 50 — 75%, через 9 месяцев — на 85 — 90%. Через 11 месяцев у мышей, получавших ПЯТd1, наблюдали интенсивное подавление размножения микроорганизмов: «урожай» в лапах был в 70 раз ниже, чем в контроле. В группе, получавшей дапсон, выявлено снижение количества микобактерий в 20 — 25 раз, что было статистически достоверно менее эффективно, чем в условиях применения ПЯТd1. **Заключение.** Новое производное 1,3-диазинона-4 под шифром ПЯТd1 способно активно подавлять размножение *M. leprae*, что свидетельствует о его специфической антимикобактериальной активности и обуславливает перспективность его дальнейшего исследования.

Журн. микробиол., 2016, № 5, С. 18—22

**Ключевые слова:** противолепрозная активность, производное 1,3-диазинона-4 ПЯТd1, модель Shepard C.C., *M. leprae*

С.А.Лужнова<sup>1</sup>, М.Ю.Юшин<sup>1</sup>, А.В.Воронков<sup>2</sup>,  
С.А.Осыченко<sup>2</sup>, Н.М.Габитова<sup>1</sup>, Е.А.Юртаева<sup>1</sup>

## EXPERIMENTAL STUDY OF SPECIFIC ACTIVITY OF 1.3-DIAZINON-4 COMPOUND PYaTd1 DERIVATIVE IN VIVO

<sup>1</sup>Research Institute for Leprosy, Astrakhan; <sup>2</sup>Pyatigorsk Medical-Pharmaceutical Institute — Branch of Volgograd State Medical University, Russia

**Aim.** Study anti-leprosy activity of a 1.3-diazinon-4 compound derivative under the laboratory code PYaTd1 on the model of intra-plantar infection of mice and evaluate the character of its antibacterial effect. **Materials and methods.** Study of specific activity was carried out *in vivo* on the experimental model of leprosy, proposed by Shepard C.C., that assumes execution of intra-plantar infection of mice with a suspension of mycobacteria, produced from lepromas or autopsy tissue of a non-treated leprosy infected, or from tissues of experimental mice, previously infected with *Mycobacterium leprae* from non-treated patients. The study was carried out on 120 CBA line mice infected with *M. leprae* (VIII passage) from patient M. Dapsone and PYaTd1 compound were

administered to animals next day after the infection with forage at a dose of 25 mg/kg for 4.5, 6, 9 and 11 months. The mice were split into 3 groups: control (infected without treatment), comparison (infected, receiving dapsone), experimental (infected, receiving PYaTd1). After the control term the mice were euthanized under chloroform anesthesia. Suspensions for quantification of mycobacteria were prepared from paw pads. Smears were stained by Ziehl—Nilsson. *Results.* After 4.5 months the intensity of infect reproduction under the effect of dapsone and PYaTd1 was reduced compared with control by 18 — 25 times. After a 6-month course — by 50 — 75% and after 9 months — by 85 — 90%. After 11 months in mice that had received PYaTd1, an intensive suppression of microorganism reproduction was observed: the yield in paws was 70 times lower than in control. In the group that had received dapsone, a reduction of the number of mycobacteria by 20 — 25 times was detected, it was significantly less effective than under the conditions of PYaTd1 administration. *Conclusion.* A novel 1,3-diazinon-4 derivative under the code PYaTd1 can actively suppress reproduction of *M. leprae*, that gives evidence regarding its specific anti-mycobacterial activity and determines perspectives of its further studies.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 5, P. 18—22

Key words: anti-leprosy activity, 1,3-diazinon-4 derivative PYaTd1, Shepard C.C. model, *M. leprae*

## ВВЕДЕНИЕ

Первый из сульфонов — дапсон был синтезирован в 1908 году, однако его антибактериальные свойства были впервые выявлены лишь в 1937 году при экспериментальной инфекции у мышей, вызываемой *Streptococcus pyogenes*. Определенная в эксперименте терапевтическая доза препарата оказалась неприменимой в клинике, т. к. была близка к токсической. Позднее была выявлена способность дапсона подавлять развитие экспериментального туберкулеза у морских свинок. Только в 1943 г. Faget и др. сообщили об успешном применении его при лепре [6].

До настоящего времени препараты сульфонового ряда остаются основными средствами лечения лепры. Однако они не лишены ряда существенных недостатков. Сроки лечения больных остаются длительными, наблюдаются токсические осложнения (гемолитическая анемия, агранулоцитоз, нейротоксичность и др.), растет первичная и вторичная резистентность к дапсону [7]. В связи с тем, что проблема лечения больных лепрой полностью не решена, изыскание новых соединений, обладающих противолепрозной активностью, сохраняет свою актуальность.

Результат первичного скрининга, проведенного нами *in vitro* в отношении *M. lufu* — тестовой культуры для первичного отбора противолепрозных препаратов [4], показал, что производное 1,3-дiazинона-4 под лабораторным шифром ПЯTd1 проявляет специфическую антимикобактериальную активность. В опытах на животных показано, что при хроническом ежедневном внутрижелудочном введении (30 дней) ПЯTd1 не вызывает гибели крыс, изменения их веса и массового коэффициента внутренних органов [3] и, в отличие от дапсона, не оказывает токсического влияния на морфофункциональные характеристики эритроцитов и мегакариоцитопоэза [2]. Это обуславливает перспективность исследования его специфической активности *in vivo*.

В связи с этим, целью нашей работы явилось исследование противолепрозной активности производного 1,3-дiazинона-4 соединения под лабораторным шифром ПЯTd1 на модели интраплантарного заражения мышей [9] и оценка характера его действия.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование специфической активности проводили *in vivo* на экспериментальной модели лепры, предложенной Shepard С.С. [9], которая предполагает осуществление интраплантарного заражения мышей суспензией микобактерий, приготовленной из лепром или аутопсийной ткани нелеченного больного лепрой, или из тканей экспериментальных мышей, ранее зараженных *M. leprae* от нелеченных больных, т.е. «из лапки в лапку».

Дапсон и соединение ПЯТd1 животным вводили вместе с кормом. Для обеспечения постоянного поступления препарата в организм мышей готовили кормолекарственную смесь путем смешивания комбикорма с исследуемым веществом. Для приготовления кормолекарственной смеси использовали специальный роторный миксер «Rotomixer» (Англия). На 1 кг сухого комбикорма добавляли 100 мг вещества (дапсона), получая, таким образом, смесь, содержащую 0,01% соединения ПЯТd1 (или дапсона) при введении мышам в дозе 25 мг/кг. Введение препарата с пищей считается наиболее оптимальным, так как этим достигается постоянная его концентрация в крови животных. Метод позволяет добиться адекватных результатов в ходе исследования. Учитывая, что мышь в сутки съедает около 5 г сухого корма, и это зависит от ее веса, который меняется с возрастом, такой способ введения вещества позволяет обеспечить строгий контроль за дозой, поступающей в организм [1]. Использование кормолекарственных смесей рекомендовано ВОЗ в качестве стандартного метода введения лекарственных препаратов, испытываемых на противолепрозную активность. В данном случае использовали максимально эффективную дозу 25 мг/кг (МЭД) [8], сопоставимую по воздействию с дозой, применяемой при лечении дапсоном больных лепрой людей (100 мг в сутки).

Работа выполнена на 120 мышах линии СВА. Животные были заражены *M. leprae* (VIII пассаж) от больного *M.* Каждой мышке интраплантарно вводили 0,03 мл суспензии, содержащей  $10^4$  микробных тел. Мышей делили на три группы: 1 — контроль (зараженные, не получавшие специфического лечения); 2 — сравнения (зараженные, получавшие дапсон); 3 — опытная (зараженные, получавшие соединение ПЯТd1). Дапсон и соединение ПЯТd1 начинали вводить на следующий день после заражения. Через 4,5; 6; 9 и 11 месяцев с начала эксперимента по 10 животных из каждой группы забивали под хлороформным наркозом, отсекали правую заднюю лапу, из которой готовили суспензию для подсчета микобактерий. Для этого тщательно срезали ткани подушечки отсеченной лапки, измельчали ножницами. Измельченные ткани перетирали в фарфоровой ступке, добавив 2,0 мл дистиллированной воды. Полученную суспензию центрифугировали 3 мин при 1000 об/мин для осаждения грубых тканевых частиц, из супернатанта готовили мазок для подсчета микобактерий. Для приготовления мазка использовали специальные предметные стекла с нанесенными на них кругами площадью  $1 \text{ см}^2$ . В середину каждого круга помещали 10 мкл 0,1% раствора альбумина в дистиллированной воде, добавляли 10 мкл исследуемой суспензии *M. leprae*. Жидкости смешивали и равномерно распределяли по поверхности круга так, чтобы наружный край мазка касался внутреннего края окружности круга. Мазок высушивали на воздухе и фиксировали над пламенем горелки, окрашивали по Цилю–Нильсону.

Подсчет количества микобактерий проводили по методу Shepard С.С. [10] под микроскопом с использованием иммерсионного объектива в любых 20 полях зрения по диаметру каждого круга. На каждую суспензию готовят по 3 мазка (на одном стекле), следовательно, общее число полей зрения, сосчитанных для каждой суспензии, составляет 60.

Все манипуляции проводили согласно [5].

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программ Biostat 2009. Показатель достоверности различий определяли по t-критерию Стьюдента.

**Динамика размножения *M. leprae* в подушечках лап мышей при различных курсах терапии (кол-во  $\times 10^8$ /мл)**

Группы	Длительность введения			
	4,5 мес.	6 мес.	9 мес.	11 мес.
Контроль	2,66 ± 0,7	5,18 ± 1,0	105,7 ± 3,7	350,0 ± 51,3
Дапсон	0,12 ± 0,03**	1,26 ± 0,4*	16,5 ± 7,8*	15,2 ± 4,3***
ПЯТd1	0,12 ± 0,025**	2,4 ± 0,6*	12,5 ± 3,5*	4,9 ± 0,98***#

Примечание: \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001 относительно контроля; # P < 0,05 относительно дапсона.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования, проведенные *in vivo* на экспериментальной модели лепры Shepard С.С., показали следующие результаты (табл.).

Как видно из табл., у мышей, зараженных *M. leprae* и не получавших лечения, «урожай» микобактерий в лапах через 4,5 месяца с начала эксперимента был значительно выше, чем у животных в условиях введения препаратов. Уровень интенсивности размножения инфекта в группах, получавших дапсон и новое производное 1,3-диазинона-4, была идентичной. Среднее количество микобактерий в 1 мл суспензии, полученной из ткани лап мышей, было снижено в сравнении с контролем в 18 — 25 раз. Через 6 месяцев со времени заражения количество микобактерий у контрольных животных продолжало нарастать. В группах, получавших лечение, степень обсемененности была ниже в 2 — 5 раз.

Активность дапсона на данном этапе исследования была выше соединения ПЯТd1, однако статистически достоверной разницы между показателями в этих группах не наблюдали.

Через 9 месяцев после начала эксперимента популяция микобактерий в лапах мышей относительно показателей 6 месяцев увеличилась в 20 раз, при введении мышам дапсона — в 13 раз, а при применении соединения ПЯТd1 — только в 5 раз. Интенсивность воздействия дапсона и соединения ПЯТd1 на размножение инфекта была сопоставимой.

Через 11 месяцев в условиях применения ПЯТd1 наблюдали интенсивное подавление размножения микроорганизмов: «урожай» в лапах был в 70 раз ниже, чем в контроле. В группе, получавшей дапсон, выявлено снижение количества микобактерий в 20 — 25 раз, что было статистически достоверно менее эффективно.

До настоящего времени исследование основных биологических аспектов *M. leprae*, включая их метаболизм и химическую структуру, тормозит тот факт, что их не удается культивировать *in vitro*, тогда как это открывало бы большие возможности для создания новых и совершенствования имеющихся диагностических, профилактических и химиотерапевтических методов для борьбы с лепрой. Действие лекарственных препаратов на *M. leprae* и лекарственная резистентность микобактерий по рекомендации ВОЗ по-прежнему в настоящее время проверяется путем введения их в подушечки лап нормальных (иммунологически интактных) мышей.

Наши исследования, проведенные на рекомендованной ВОЗ модели, позволили оценить способность нового производного 1,3-диазинона-4 под шифром ПЯТd1 влиять на интенсивность размножения пассированного штам-

ма *M. leprae*, изначально выделенного из организма больного, и сравнить его действие с основным противолепрозным препаратом дапсоном. Результаты исследования показали, что при длительном введении соединения ПЯТd1 в условиях *in vivo* выявлено выраженное снижение интенсивности нарастания популяции *M. leprae* в подушечках лап животных. Воздействие соединения не только сопоставимо с действием основного противолепрозного препарата дапсона, но и при более длительном курсе превосходит его.

Таким образом, соединение ПЯТd1 способно активно подавлять размножение *M. leprae*, что свидетельствует о специфической антимикобактериальной активности производного 1,3-диазинона-4 под шифром ПЯТ1 и обуславливает перспективность его дальнейшего исследования.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Батрак Г.Е., Кудрин А.Н. Дозирование лекарственных средств экспериментальным животным. М., Медицина, 1979.
2. Воронков А.В., Лужнова С. А., Осыченко С.А., Габитова Н.М. Оценка влияния нового производного диазинона ПЯТd1 на некоторые показатели периферической крови крыс обоего пола. Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. 2015, 4 (56): 124-126.
3. Воронков А.В., Кодониди И.П., Лужнова С. А., Ловягина С.А., Авраменко Н.С., Сочнев В.С., Воронкова М.П., Габитова Н.М. Изучение влияния соединения ПЯТd1 на динамику веса и массовый коэффициент органов животных. Фундаментальные исследования. 2015, 2: 3319-3322.
4. Лужнова С.А., Габитова Н.М., Воронков А.В., Кодониди И.П., Ловягина С.А., Сочнев В.С. Оценка антимикобактериальной активности новых производных диазинона. Фундаментальные исследования. 2015, 2: 2377-2380.
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. А.Н. Миронова (ред.). М., Гриф и К, 2012.
6. Урляпова Н.Г. Чувствительность микобактерий лепры и туберкулеза к производным дихлормалеиновой кислоты. Дис. канд. мед. наук. М., 1985.
7. Ghu G.I., Stiller M.G. Dapsone end sulfones in dermatologi overview and update. J. Am. Acad. Dermatol. 2001, 45(3):420-434.
8. Levi L. Activity of derivatives and analogs of dapsone against *Mycobacterium leprae*. Antimicrobial Agent Chemother. 1978, 14: 791-793.
9. Shepard C. C. The experimental disease that follows the infection of human leprosy bacilli into footpads of mice. J. Exp. Med. 1960, 112: 445-458.
10. Shepard C.C. Drugs against *M. leprae* in the mouse and in man. Int. J. Lepr. 1968, 36: 650.

*Поступила 23.03.16*

Контактная информация: Лужнова Светлана Алексеевна, к.б.н.,  
414057, Астрахань, пр. Н.Островского, 3, р.т. (8512)34-72-84

Е.А.Хромова, Э.А.Ахматова, С.А.Сходова, И.А.Семочкин,  
В.Г.Хоменков, Н.К.Ахматова, М.П.Костинов

## ВЛИЯНИЕ ПРОТИВОГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН НА СУБПОПУЛЯЦИИ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК КРОВИ

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

**Цель.** Исследование влияния сплит-вакцины Ваксигрип, субъединичной Инфлювак и иммуноадьювантной вакцины Гриппол плюс на содержание в крови миелоидных (mDC) и плазмацитоидных (pDC) дендритных клеток (ДК) у вакцинированных здоровых женщин. **Материалы и методы.** Исследовали кровь 30 здоровых женщин 18 — 50 лет через 7 и 30 дней после вакцинации. Проводили иммунофенотипирование pDC (CD14+CD16-/CD85k(ILT3)-PE/CD123-PC5) и mDC (CD14+CD16-/CD85k(ILT3)-PE/CD33-PC5) с использованием МКАТ (Beckman Coulter, Франция) на проточном цитометре Cytomix FC-500 (Beckman Coulter, США). **Результаты.** Использование безадьювантных вакцин Ваксигрип и Инфлювак приводило к повышению численности mDC и pDC ( $p < 0,05$ ) в крови вакцинированных только на 7 сутки наблюдения. Гриппол плюс приводил к более существенному (в 2,2 — 3,6 раза,  $p < 0,05$ ) увеличению субпопуляций ДК (по сравнению с безадьювантными вакцинами) как на 7 сутки, так и через месяц после вакцинации. **Заключение.** Вакцинация гриппозными вакцинами активирует врожденные эффекторы — первое звено на пути проникновения инфекции — дендритные клетки как миелоидного, так и лимфоидного происхождения. При этом более выраженный и продолжительный эффект такой активации наблюдается при использовании иммуноадьювантной вакцины по сравнению с субъединичной и сплит-вакцинами.

Журн. микробиол., 2016, № 5, С. 23—28

Ключевые слова: гриппозные иммуноадьювантная и безадьювантная вакцины, миелоидные и плазмацитоидные дендритные клетки

Е.А.Chromova, E.A.Akhmatova, S.A.Skhodova, I.A.Semochkin,  
V.G.Khomenkov, N.K.Akhmatova, M.P.Kostinov

## EFFECT OF INFLUENZA VACCINES ON SUBPOPULATIONS OF BLOOD DENDRITIC CELLS

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

**Aim.** Study the effect of Vaxigrip split, Influvac subunit and Grippol plus immune-adjuvanted vaccines on the content of myeloid (mDC) and plasmacytoid (pDC) dendritic cells (DC) in blood of vaccinated healthy women. **Materials and methods.** Blood of 30 healthy women aged 18-50 years was studied at days 7 and 30 after the vaccination. pDC (CD14+CD16-/CD85k(ILT3)-PE/CD123-PC5) and mDC (CD14+CD16-/CD85k(ILT3)-PE/CD33-PC5) immune phenotyping was carried out using mAbs (Beckman Coulter, France) and flow cytometer Cytomix FC-500 (Beckman Coulter, USA). **Results.** Use of unadjuvanted vaccines Vaxigrip and Influvac resulted in an increase of the numbers of mDC and pDC ( $p < 0.05$ ) in blood of the vaccinated only at day 7 of the observation. Grippol resulted in a more significant (2.2 — 3.6 times,  $p < 0.05$ ) increase of DC subpopulations (compared with unadjuvanted vaccines) at both day 7 and a month after the vaccination. **Conclusion.** Influenza vaccination activated innate effectors — the first component on the way of infection penetration — dendritic cells of both myeloid and lymphoid origin. Wherein, a more pronounced and prolonged effect of such activation is observed when immune-adjuvanted vaccine is used compared with subunit and split vaccines.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 5, P. 23—28

Key words: influenza immune-adjuvanted and unadjuvanted vaccines, myeloid and plasmacytoid dendritic cells



## ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на то, что вакцинация от гриппа считается наиболее эффективным методом профилактики, использование субъединичных или расщепленных вакцин, особенно среди лиц пожилого возраста, может оказаться не вполне эффективным [8]. Для этой возрастной группы рекомендуется инактивированная вакцина против гриппа, которая содержит вирусный гемагглютинин (НА), белки трех или четырех циркулирующих штаммов гриппа H1N1, H3N2 и штамма В. Низкая эффективность гриппозной вакцины у пожилых по сравнению с молодыми была связана с иммунологическим старением [2], таким как нарушение генерации клеток, секретирующих антитела (ASCs) [8], Т-клеток памяти CD8 + [13] и CD4 + Т-клеток [5]. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе сниженной эффективности вакцины, остаются не исследованными.

Особенно это касается использования в составе вакцин адъювантов. Адъюванты обычно повышают иммуногенность совместно вводимых антигенов, но к сожалению, также мало известно о механизмах их действия. Поэтому в данной работе мы попытались выяснить влияние сплит-вакцины Ваксигрип, субъединичной Инфлювак и иммуноадъювантной вакцины Гриппол плюс на содержание в крови дендритных клеток миелоидного и плазмацитоидного происхождения у иммунизированных лиц.

Дендритные клетки (ДК) являются специализированными антиген-представляющими клетками (АРС), которые играют ключевую роль в иммунном ответе, являясь связующим звеном между врожденным и адаптивным иммунитетом [15]. Они созревают при распознавании патогенов и сверхрегулируют экспрессию МНС молекул и костимулирующих рецепторов для активации антиген-специфических CD4 (+) и CD8 (+) Т-клеток. В настоящее время установлено, что ДК являются неоднородной популяцией, состоящей из различных субпопуляций со специализированными функциями в иммунном ответе на конкретные патогены. При вирусных инфекциях, плазмацитоидные ДК (pDCs) быстро продуцируют большое количество IFN- $\alpha$ , который обладает мощным противовирусным эффектом и активирует несколько типов других иммунных клеток. Но, тем не менее, pDCs могут индуцировать толерогенный цитокин IL-10 CD4 (+) Т-клетками. В противоположность им, миелоидные ДК (mDCs) являются очень мощными АРС и обладают уникальной способностью праймировать наивные Т-клетки и, следовательно, инициировать первичный адаптивный иммунный ответ. Были определены различные субпопуляции mDCs со специализированными функциями. Установлено, что CD8 $\alpha$  (+) mDCs захватывают антигенный материал от некротических клеток, секретируют высокий уровень IL-12, а также праймируют Th1 и цитотоксические Т-клетки для контроля за внутриклеточными патогенами. С другой стороны, CD8 $\alpha$  (-) mDCs преимущественно праймируют CD4 (+) Т-клетки и способствуют Th2 или Th17 дифференциации. BDCA-3 (+) mDC2 являются человеческим гомологом CD8 $\alpha$  (+) mDCs, так как они разделяют экспрессию нескольких ключевых молекул, способность к кросс-презентации антигенов CD8 (+) Т-клеткам и продуцируют IFN- $\lambda$  [3]. Показано, что pDCs могут координировать события при вирусной инфекции, атопии, аутоиммунных заболеваниях и раке [9].

Цель статьи — определение субпопуляций дендритных клеток в крови женщин, иммунизированных адъювантной и безадъювантными вакцинами против гриппа.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании принимали участие 30 здоровых женщин 18 — 50 лет, которых иммунизировали адьювантной (Гриппол плюс) и безадьювантными (Ваксигрип и Инфлювак) вакцинами против гриппа. Исследовали кровь через 7 и 30 дней после вакцинации.

Забор крови у женщин осуществляли строго натошак из локтевой вены обследуемых в стерильных условиях. Исследовали кровь с раствором антикоагулянта — динатриевой соли ЭДТА (Serva) в конечной концентрации 0,26%. Кровь инкубировали с МкАТ к плазмацитоидным (CD14+CD16-/CD85k(ILT3)-PE/CD123-PC5) и миелоидным (CD14+ CD16-/CD85k(ILT3)-PE/CD33-PC5) ДК. Все процедуры по иммунофенотипированию ДК проводили согласно инструкции производителя (Beckman Coulter, Франция). Пробы анализировали на проточном Cytomix FC-500 (Beckman Culter, США) в течение 6 часов после иммунного окрашивания. Гейт (окно) популяции клеток устанавливали на основе комбинации прямого и бокового светорассеяния и размера клеток. Сначала гейтировали область всех лейкоцитов (PBMC), затем выстраивали значения всех гейтированных событий так, чтобы FL4 (CD123-PC5) отображалось против SS. Лейкоциты гейтировали регионом А, а регионом В отсекали все CD123-негативные клетки. События по FL1 (CD14+CD16)-FITC располагали против FL2 (ILT3-PE). Выделяли регион С с CD(14+16)-/ILT3+ клетками. Визуально эозинофилы отображались в правом нижнем углу области С. После чего события гейтировали по регионам А и В и С: FL4 (CD123-PC5) располагали против FL2 (ILT3-PE). Регион D ограничивал CD123<sup>bright</sup>/ILT3<sup>bright</sup> события. Процент ДК среди PBMC рассчитывался путем деления числа событий в гейте D на число событий в гейте PBMC.

Статистическая значимость различий уровня ДК между группами оценивали непараметрическими методами исследования с помощью критерия Манна—Уитни. Статистически достоверными считали различия при  $P \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Как видно из табл., содержание плазмацитоидных ДК (pDC) в группе лиц, вакцинированных Ваксигрипом, на 7 сутки (0,712%) повышалось по сравнению с группой до вакцинации (0,381%) в 1,87 раза, миелоидных дендритных клеток (mDC) (1,366%) в 2,96 раза,  $p < 0,05$ , соответственно повышались их абсолютные показатели с 8,51 до 9,16 кл/мл (pDC) и с 10,23 до 12,94 кл/мл (mDC). Через месяц после вакцинации все эти показатели практически возвращались к уровню нормальных.

Инфлювак по механизму действия мало отличался от Ваксигрипа, но все же проявлял тенденцию к меньшему нарастанию численности как pDC, так и mDC по сравнению с последним.

Вакцинация Грипполом плюс более существенно ( $p < 0,001$ ) по сравнению с исследуемыми безадьювантными вакцинами повышала уровень ДК в крови. Через 7 дней уровень pDC достигал 1,61%/16,16 кл/мл в группе с Грипполом (больше уровня в группе с Ваксигрипом в 2,26/1,76 раза, в группе с Инфлюваком в 3,12/1,83 раза), а через месяц — 1,414%/15,76 кл/мл (больше уровня в группе с Ваксигрипом в 3,52/1,79 раза, в группе с Инфлюваком в 3,58/1,85 раза).

Уровень mDC у вакцинированных Грипполом плюс также был выше по сравнению с группой с Ваксигрипом и Инфлюваком. Через 7 дней: соответственно выше в 1,68/1,5 раза (2,3%/19,38 кл/мл) и 3,95/1,55 раза (0,582%/

12,48 кл/мл); через 1 мес. — 2,89/1,7 раза (1,734%/18,74 кл/мл) и в 3,67/1,77 раза (0,472%/10,6 кл/мл).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что продуктивный иммунный ответ определяется клональной экспансией антиген-специфических Т- и/или В-клеток. Этот процесс изначально требует представления антигена наивным Т-клеткам с участием TCRs или В-клеткам, экспрессирующих иммуноглобулиновые рецепторы. Но кроме этих условий для формирования полноценного адаптивного ответа необходимы еще и другие сигналы: доставка костимуляторных молекул или цитокинов антигенпрезентирующими клетками для праймирования Т-хелперов. Эти процессы запускают антиген-специфическую помощь для В-клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) [15].

Все эти факторы должны учитываться при конструировании вакцин. В настоящее время для профилактики гриппозной инфекции используют как адьювантные, так и безадьювантные вакцины. В отсутствие адьюванта может возникнуть слабый иммунный ответ, и наивные антиген-специфические Т-клетки при распознавании антигена могут стать толерогенными.

Как видно из наших исследований, использование сплит-вакцины Ваксигрип приводило к повышению численности ДК ( $p < 0,05$ ) в крови вакцинированных (с небольшим перевесом в сторону клеток миелоидного происхождения) только на 7 сутки наблюдения. Через месяц эти показатели уже не отличались от исходного уровня. Аналогичная картина наблюдалась и в отношении субъединичной вакцины Инфлювак. Ее активность даже была несколько ниже Ваксигрипа, что, вероятно, можно объяснить содержанием в сплит-вакцине более широкого набора вирионных белков.

Изменение динамики плазматомных и миелоидных дендритных клеток периферической крови здоровых лиц в ходе вакцинации против гриппа сплит (Ваксигрип), субъединичной (Инфлювак) и иммуноадьювантной (Гриппол плюс) вакцинами

Маркеры ДК	Содержание клеток	M±σ (%); Ме±(Q; UQ)					
		Ваксигрип		Гриппол плюс		Инфлювак	
		7 сут	1 мес.	7 сут.	1 мес.	7 сут.	1 мес.
CD14+ CD16- / CD85k (ILT3) / CD123 (Плазматомные ДК)	% клеток на 100 тыс. лейкоцитов	0,381±0,0067 0,38 (0,38—0,385)	0,402±0,018 0,4 (0,4—0,42)	1,61±0,136** 1,56 (1,52—1,7)	1,414±0,168** 1,39 (1,3—1,4)	0,516±0,027* 0,51 (0,5—0,53)	0,395±0,016 0,39 (0,38—0,4)
	Клеток/мл	8,51±0,45 9,39 (9,398-6,7)	8,798±0,291 8,79 (8,53-9)	16,16±2,0** 16,7 (15,8-17,3)	15,76±2,08** 15,8 (15,1-17)	9,06±0,27* 9,1 (8,9-9,2)	8,5±0,41 8,5 (8,4-8,7)
CD14+ CD16- / CD85k (ILT3) / CD33 (Миелоидные ДК)	% клеток на 100 тыс. лейкоцитов	0,461±0,05 0,475 (0,42—0,49)	0,598±0,14 0,53 (0,49—0,7)	2,3±0,28** 2 (1,9—2,1)	1,734±0,143** 1,77 (1,61—1,85)	0,582±0,07* 0,55 (0,53—0,64)	0,472±0,043 0,47 (0,44—0,51)
	Клеток/мл	10,23±0,94 10,4 (9,87—10,9)	10,9±0,85 10,9 (10,8—11)	19,38±1,37** 19,5 (18,3—20,1)	18,74±1,2** 19,5 (18,1—19,9)	12,48±1,06* 12,8 (11,8—13,2)	10,6±0,51 10,6 (10,2—11)

Примечание. M±σ — средняя арифметическая ± стандартное отклонение; Ме — медиана значений, I Q; U Q — нижний и верхний квартили. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,001$  — достоверность полученных значений по сравнению с группой до вакцинации; #  $P > 0,001$  — по сравнению с группой лиц, вакцинированных вакиной Ваксигрип и Инфлювак (Mann—Whitney U-test).

Гриппол плюс приводил к более существенному ( $p < 0,001$ ) увеличению субпопуляций ДК также на 7 сутки, но при этом отмечалось сохранение этого уровня практически через 1 мес. после вакцинации.

Этот факт, вероятно, можно объяснить с позиций концепций иммуногенности. Во-первых, связанных с понятием географической обусловленности иммунной реактивности, где индукция иммунного ответа критически зависит от антигена (сигнал 1), достигшего регионарных лимфоидных органов. Антиген, который не достигает дренирующих лимфатических узлов, является неотвечающим [7].

Во-вторых, теории эффекта депо, которая подчеркивает важность локализации антигена в течение продолжительного периода времени после иммунизации для активации Т-клеток в лимфатических узлах; удержание антигена на фолликулярных ДК внутри лимфоузла отвечает за стимулирование продолжительной продукции антител [14].

В-третьих, парадигма, когда адьюванты действуют как сигнал 0; то есть распознавание консервативных микробных структур, так называемых патоген-ассоциированных микробных структур (PAMPs) [6], при помощи патоген-распознающих рецепторов (PRRs), которые конститутивно экспрессируются на клетках врожденной иммунной системы [4]. В отличие от клонально экспрессированных гипервариабельных антиген-специфических рецепторов на Т- и В-клетках, генерированных случайными генными реаранжировками, распознавание молекул врожденными иммунными клетками (PRRs) кодируется неререаранжируемыми генами, которые не отличаются генетической пластичностью и зависят от половых мутаций. Поскольку PRRs играют важную роль в формировании сигнала 2 на APCs, они направляют иммунный ответ таким образом, что клетки приобретенной иммунной системы получают «инструкцию», когда, где и как реагировать [9].

Было высказано предположение, что адьюванты могут имитировать микробные структуры, а также было выдвинуто предположение, что в основе их иммуногенности может быть распознавание определенных микробных дериватов по филогенетически древним PRRs, присутствующих на клетках врожденного иммунитета [7]. Это, вероятно, относится к адьювантам на основе микробных компонентов, таких как коклюшный токсин, микобактерии, мурамилпептиды, LPS, липид А или CpG-богатые мотивы. С3d компонент компонента, конъюгированный с антигеном, также активно стимулирует антиген-специфический антительный ответ, и может рассматриваться как молекулярный адьювант врожденного иммунитета [1].

В-четвертых, гипотеза, что адьюванты индуцируют или выступают в качестве молекул опасности; сигналы опасности от стрессированных или поврежденных тканей поступают к антиген-представляющим клеткам, в результате чего усиливается экспрессия костимулирующих молекул. При этом, передача сигналов рекомбинантных цитокинов или костимуляторных молекул имитирует классическую адьювантную активность. Этапы, связанные с передачей сигналов с PRR, сигналов опасности и доставкой костимулирующих молекул APCs способствуют презентации антигена Т- и В-клеткам с последующим их праймированием. Сигналы, идущие от APCs, в свою очередь, могут служить в качестве природных адьювантов [11, 12].

Резюмируя вышеизложенное, можно сделать предположение, что вакцинация гриппозными вакцинами активизирует врожденные эффекторы — первое звено на пути проникновения инфекции — дендритные клетки как миелоидного, так и лимфоидного происхождения. При этом, более выраженный и

продолжительный эффект такой активации наблюдается при использовании иммуoadъювантной вакцины по сравнению с субъединичной и сплит-вакцинами.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Bergmann-Leitner E.S., Leitner W.W., Tsokos G.C. Complement 3d: from molecular adjuvant to target of immune escape mechanisms. *Clin. Immunol.* 2006, Nov; 121 (2): 177-185.
2. Duraisingham S.S., Rouphael N., Cavanagh M.M. et al. Systems biology of vaccination in the elderly. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2013, 363: 117-142.
3. Geginat J., Nizzoli G., Paroni M. et al. Immunity to pathogens taught by specialized human dendritic cell subsets. *Front. Immunol.* 2015, Oct 13; 6: 527.
4. Iwasaki A., Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat. Immunol.* 2015, Apr; 16 (4): 343-353.
5. Kang I., Hong M.S., Nolasco H. et al. Age-associated change in the frequency of memory CD4+ T cells impairs long term CD4+ T cell responses to influenza vaccine. *J. Immunol.* 2004, 173: 673-681.
6. Martins K.A., Bavari S., Salazar A.M. Vaccine adjuvant uses of poly-IC and derivatives. *Expert. Rev. Vaccines.* 2015, Mar; 14 (3): 447-459.
7. Moyer T.J., Zmolek A.C., Irvine D.J. Beyond antigens and adjuvants: formulating future vaccines. *J. Clin. Invest.* 2016, Mar 1; 126 (3): 799-808.
8. Sasaki S., Sullivan M., Narvaez C.F. et al. Limited efficacy of inactivated influenza vaccine in elderly individuals is associated with decreased production of vaccine-specific antibodies. *J. Clin. Invest.* 2011, 121: 3109-3119.
9. Schenten D., Medzhitov R. The control of adaptive immune responses by the innate immune system. *Adv. Immunol.* 2011, 109: 87-124.
10. Schettini J., Mukherjee P. Physiological role of plasmacytoid dendritic cells and their potential use in cancer immunity. *Clin. Dev. Immunol.* 2008;2008:106321. doi: 10.1155/2008/106321.
11. Schijns V. Immunological concepts of vaccine adjuvant activity. *Commentary. Curr. Op. Immunol.* 2000, 12: 456-463.
12. Trumfheller C., Longhi M.P., Caskey M. et al. Dendritic cell-targeted protein vaccines: a novel approach to induce T-cell immunity. *J. Intern. Med.* 2012, Feb; 271 (2): 183-192.
13. Wagar L.E., Gentleman B., Pircher H. et al. Influenza-specific T cells from older people are enriched in the late effector subset and their presence inversely correlates with vaccine response. *PLoS ONE.* 2011, 6: e23698.
14. Wang C., Liu P., Zhuang Y. et al. Lymphatic-targeted cationic liposomes: a robust vaccine adjuvant for promoting long-term immunological memory. *Vaccine.* 2014, Sep 22; 32 (42): 5475-5483.
15. Yoo S., Ha S.J. Generation of tolerogenic dendritic cells and their therapeutic applications. *Immune Netw.* 2016, Feb; 16 (1): 52-60.

*Поступила 23.03.16*

Контактная информация: Ахматова Нелли Кимовна,  
105064, М.Казенный пер., 5а, р.т. (495)917-07-74

*В.А.Алешкин, Н.Т.Тихонова, А.Г.Герасимова, О.В.Цвиркун,  
С.В.Шульга, Е.Б.Ежлова, А.А.Мельникова*

## **ПРОБЛЕМЫ НА ПУТИ ДОСТИЖЕНИЯ ЭЛИМИНАЦИИ КОРИ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии, им. Г.Н.Габричевского

Внедрение в повседневную практику живых коревых вакцин привело к выраженному снижению заболеваемости корью во многих странах, что позволило ВОЗ разработать программу ликвидации кори в мире. Российская Федерация приступила к реализации программы ликвидации местных случаев кори в стране (элиминации кори) в 2002 году и добилась существенных успехов к 2007 году. В течение четырех лет (2007 — 2010 г.г.) показатель заболеваемости корью в Российской Федерации не превышал критерий элиминации кори ВОЗ — не более 1 случая кори на 1 млн населения. Однако с 2011 года ситуация по кори в России стала ухудшаться, являясь отражением роста заболеваемости корью во многих регионах мира. Основной причиной роста заболеваемости корью явилось накопление контингента не привитых против кори лиц на фоне выраженной внутренней и внешней миграции населения. При условии постоянного поддержания высокого уровня охвата населения прививками (более 95%) на всей территории России задача элиминации кори в стране может быть решена успешно.

Журн. микробиол., 2016, № 5, С. 29—34

Ключевые слова: корь, элиминация, вакцины

*V.A.Aleshkin, N.T.Tikhonova, A.G.Gerasimova, O.V.Tsvirkun,  
S.V.Shulga, E.B.Ezhlova, A.A.Melnikova*

## **PROBLEMS TOWARDS MEASLES ELIMINATION IN RUSSIAN FEDERATION**

Gabrichovsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Russia

Introduction of live measles vaccines into daily practice resulted in a pronounced reduction of measles morbidity in many countries, that allowed WHO to develop the measles eradication program. Russian Federation has commenced realization of the eradication program for local measles cases in the country (measles elimination) in 2002 and had achieved significant success by 2007. For 4 years (2007 — 2010) the parameter of measles morbidity in Russian Federation did not exceed the WHO measles elimination criteria — no more than 1 measles case per 1 million population. However, the situation for measles began to deteriorate from 2011, reflecting the growth of measles morbidity in many regions of the world. The main reason for measles morbidity growth was accumulation of a contingent of individuals not immunized against measles against the background of internal and external population migration. Under the condition of constant maintenance of a high vaccination coverage of the population (above 95%) on the whole territory of Russia, the objective of measles elimination in the country can be successively met.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 5, P. 29—34

Key words: measles, elimination, vaccines

В настоящее время научной и медицинской общественностью достаточно широко обсуждается вопрос о целесообразности и возможности достижения ликвидации кори, что, прежде всего, связано с ростом заболеваемости корью в последнее пятилетие в некоторых регионах мира, в том числе в Российской Федерации, на фоне реализации программы по элиминации кори.

На наш взгляд, на современном этапе возможность ликвидации кори не

вызывает сомнения, поскольку основывается на реальных научных теоретических предпосылках и опыте практического здравоохранения.

Теоретическая возможность ликвидации кори обусловлена наличием единого антигенного варианта вируса кори, отсутствием других, кроме человека, резервуаров вируса кори в природе, выраженной манифестностью клинических форм инфекции и отсутствием носительства вируса кори в скрытой форме, а также формированием стойкого, практически пожизненного, иммунитета после заболевания.

К практическим аспектам, обосновывающим возможность достижения глобальной элиминации кори, следует отнести повсеместное на фоне массовой иммунизации населения против кори снижение заболеваемости этой инфекцией, ликвидация смертности во многих странах мира, в том числе в Российской Федерации.

Научные данные, свидетельствующие о том, что корь является строгим антропонозом, при котором отсутствует бессимптомное носительство, наличие высокоэффективных живых коревых вакцин, а также опыт реализации программ ликвидации натуральной оспы и полиомиелита стали предпосылками к разработке программы ликвидации кори, разработанной ВОЗ в 90-е годы прошлого века.

Корь может стать третьей инфекцией, вслед за оспой и полиомиелитом, которая перестанет наносить экономический и моральный ущерб человеческому сообществу. Это положение нашло отражение в Стратегической программе предупреждения кори и врожденной краснушной инфекции в Европейском регионе, целью которой являлось прекращение эндемичной циркуляции вируса кори в регионе к 2010 году, а также в Программе ликвидации кори на территории Российской Федерации к 2010 году (приказ Минздрава России от 19.08.2002 № 270). Благодаря организации комплекса профилактических и противоэпидемических мероприятий цель отечественной программы была практически выполнена: показатель заболеваемости корью в Российской Федерации в течение четырех лет (2007 — 2010 гг.) не превышал критерия элиминации (ликвидации местных случаев) кори, определенного ВОЗ — не более 1 случая на 1 млн населения.

Однако впоследствии в силу различных причин во многих регионах мира, в том числе в России, намечилось ухудшение эпидемиологической ситуации по кори, что определило перенос достижения ликвидации местных случаев кори (элиминации этой инфекции) в Европейском регионе на более поздние сроки — первоначально на 2015 год, позднее — на 2020 год.

В 2013 — 2015 гг. корь регистрировалась даже в тех странах, в которых длительное время случаи кори либо не выявлялись, либо обнаруживались единичные случаи заболевания (США, Канада, большинство европейских государств). Анализ прививочного статуса заболевших корью свидетельствует, что в Европейском регионе, как и во всем мире, подавляющее большинство заболевших составляют лица, не привитые против кори или не имеющие достоверных данных о проведенной вакцинации.

На 64 сессии Европейского регионального комитета ВОЗ, состоявшейся в Копенгагене 15 — 17 сентября 2014 года, был принят Европейский план действий региона в отношении вакцин, в котором были определены шесть специфических для региона целей, достижение которых должно улучшить жизнь миллионов людей. Весьма важно, что второй по значимости целью Европейского плана действий является достижение элиминации кори и краснухи к 2020 году. В соответствии со Стратегическим планом ВОЗ по глобальной

ликвидации кори и краснухи в 2020 году планируется достичь ликвидации кори и краснухи в 5 регионах мира.

Целью отечественной программы Профилактика кори и краснухи в период верификации их элиминации в Российской Федерации (2013 — 2015 гг.) являлось достижение, поддержание и верификация элиминации кори и краснухи на территории Российской Федерации к 2015 году.

Однако конечная цель программы не была достигнута из-за недостаточного уровня популяционного иммунитета. После нескольких лет эпидемиологического благополучия (2007 — 2010 годы) в 2011 году ситуация по кори в Российской Федерации стала ухудшаться, являясь отражением ухудшения ситуации по кори в мире, в частности, на территориях сопредельных государств. В 2014 году показатель заболеваемости корью в стране по сравнению с показателем 2013 года (1,63 на 100 тыс. населения) увеличился практически вдвое и составил 3,23 на 100 тыс. населения. Всего в 2014 году было зарегистрировано 4711 случаев кори, 88,9% из которых приходилось на субъекты Северо-Кавказского и Южного федеральных округов, а также на Москву и Московскую область. Заболеваемость регистрировалась в 70 из 85 регионов страны. Выраженные миграционные процессы, развитие бизнеса и туризма отразились на скорости и объемах внешней миграции. В 2014 году на 23 территориях Российской Федерации зарегистрировано 95 импортированных случаев кори (2% от всех зарегистрированных случаев) из 28 стран. Чаше импортирование наблюдалось с территории Украины (18), Азербайджана (11) и Казахстана (9).

В последние годы в появлении и вторичном распространении кори резко возросла роль труднодоступных для проведения прививок групп населения (кочующих цыган, переселенцев, религиозных общин, трудовых мигрантов). В 2014 году среди заболевших корью были 802 человека из вышеуказанных социальных групп населения, что составило 17% от общего числа больных.

Существенно увеличилось число внутрибольничных очагов кори — 44 против 23 в 2012 году. Основными причинами формирования внутрибольничных очагов явились: наличие не привитого против кори персонала лечебно-профилактических организаций, отсутствие у них достоверных данных о прививочном анамнезе, а также позднее проведение противоэпидемических мероприятий при заносе кори в лечебное учреждение, связанное, как правило, с несвоевременной диагностикой кори у первого заболевшего.

При осуществлении эпидемиологического надзора за корью и краснухой, особенно в период элиминации этих инфекций, возрастает роль молекулярно-генетического мониторинга вирусов. Определение генотипа циркулирующих среди населения штаммов вирусов кори и краснухи играет двойную роль: во-первых, является одним из определяющих аргументов, свидетельствующих о прекращении циркуляции эндемичных штаммов на той или иной территории, во-вторых, позволяет проследить пути импортирования вируса.

Данные молекулярно-генетического мониторинга свидетельствовали, что подъем заболеваемости корью в Российской Федерации, начавшийся с октября 2011 г. и продолжавшийся до середины 2014 г., представляет собой не единую вспышку, а целую серию вспышек инфекции, обусловленных множественным повторным импортированием вирусов разных генотипов (генетических линий) различного происхождения, многие из которых ранее на территории России не циркулировали. Однако если в период с 2010 года по 2013 год на территории Российской Федерации эндемичный генотип вируса кори не выявлялся, то заболеваемость корью в стране на протяжении 2014 года, в



основном, характеризовалась продолжающейся циркуляцией импортированных штаммов одного генотипа — D8. Такая продолжительная циркуляция была обусловлена как наличием достаточно большого числа чувствительных к кори лиц в популяции в ряде регионов Российской Федерации (Москва, Московская область, субъекты Северо-Кавказского и Южного федеральных округов), так и повторным импортированием этого генотипа из других стран: Таиланда, Казахстана, Польши, Украины, Турции, Республики Абхазия и ряда европейских государств.

Весь период элиминации кори сопровождался разработкой и внедрением в практику дополнительных мероприятий, направленных на предупреждение распространения инфекции в случае заноса ее извне. С этой целью в 2005 году был введен активный поиск больных корью среди лиц с другими экзантемными заболеваниями, протекающими с лихорадкой и пятнисто-папулезной сыпью, независимо от первичного диагноза.

Для выявления случаев кори среди больных с экзантемными заболеваниями исследовали сыворотки крови пациентов на содержание противокоревых IgM. Критерием полноты обследования больных был принят индикатор 2 обследованных на 100 тыс. населения. Хотя с помощью активного эпиднадзора выявляется небольшое число пациентов, больных корью, тем не менее, значение активного поиска случаев кори в условиях элиминации несомненно. Прежде всего, потому, что сохраняется внимание медицинских работников к этой инфекции и создается возможность проконтролировать уровень привитости среди контактных лиц. Во-вторых, активный поиск случаев кори среди пациентов с экзантемными заболеваниями позволяет получить еще одно доказательство ликвидации местных случаев кори в стране.

В 2007 году в Национальный календарь профилактических прививок (приказ Минздравсоцразвития России № 673 от 30.10.2007) и в календарь профилактических прививок Министерства обороны Российской Федерации была введена дополнительная вакцинация лиц в возрасте 18-35 лет, не привитых против кори, не болевших корью ранее, не имеющих сведений о прививках. В 2011 году в Национальный календарь профилактических прививок введена обязательная двукратная иммунизация лиц в возрасте до 35 лет против кори (приказ Минздравсоцразвития России от 31.01.2011 № 51н «Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям»).

Для уменьшения контингента восприимчивого к вирусу кори населения Российской Федерации были проведены дополнительные мероприятия по иммунизации населения, направленные на увеличение охвата профилактическими прививками и повышение иммунной прослойки населения.

По итогам за 2014 — 2015 годы против кори были привиты более 10 млн чел., в т.ч. более 7 млн детей. Эти мероприятия привели к выраженному снижению заболеваемости корью в стране к концу 2015 года: всего в 2015 году был зарегистрирован 841 случай кори, показатель заболеваемости снизился до 0,58 на 100 тыс. населения.

Следует отметить, что, несмотря на рост заболеваемости корью, ежегодно преобладали очаги с 1 случаем заболевания (75 — 93,9%), что свидетельствует о достаточно высоком уровне коллективного иммунитета к вирусу кори на большинстве территорий страны.

На протяжении всех последних лет сохраняется неравномерное распределение заболеваемости по территориям страны. На большинстве территорий (в среднем 75%) случаи заболевания не регистрируются или регистрируются

на спорадическом уровне, наибольшее число случаев кори (до 85%) регистрируется на территориях московского и ростовского региональных центров, т.е. в условиях элиминации четко выявляются территории риска заболеваемости. В московском регионе подъем заболеваемости корью определяется в основном выраженной миграцией населения, большим числом завозных случаев кори, возросшим отказом населения от прививок, что свидетельствует о недостаточной работе медицинских работников с населением; более 80% заболевших корью — не привитые против этой инфекции либо лица с неизвестным коревым анамнезом. На территориях ростовского регионального центра перво-степенное значение, по-видимому, имеет недостаточное внимание к условиям доставки и хранения вакцины, а также достоверность сведений о вакцинации трудно доступных групп населения. Недоучет взрослого населения, дефекты в планировании и проведении вакцинопрофилактики приводят к появлению восприимчивой когорты населения и возникновению вспышки в случае завоза инфекции из других регионов.

В течение последних лет заболеваемость корью поддерживается контингентом не привитых против кори лиц и лиц с неизвестным прививочным анамнезом, на долю которого приходится в целом более 75%. В группе привитых корью заболел 1 привитой человек на 1,5 млн вакцинированных и ревакцинированных, а в группе непривитых — 1 на каждые 200 тыс. непривитых. Подобное соотношение заболеваемости по прививочному анамнезу свидетельствует об эффективности вакцинации как массового профилактического мероприятия. Индекс эффективности вакцинации составлял 3,0 в 2011 году; 3,4 в 2012 году; 3,8 в 2013 году, что подтверждает данный вывод. Более того, в течение всех последних лет не наблюдается увеличения доли привитых ЖКВ среди заболевших корью.

Итак, возможна ли элиминация кори в Российской Федерации и целесообразно ли разрабатывать программы по элиминации этой инфекции, несмотря на рост заболеваемости корью в стране в отдельные годы? Еще в 1968 году, через год после внедрения в практику живой коревой вакцины в СССР (ЖКВ Л-16), А.А.Сморозинцев рассматривая итоги применения вакцины, высказал идею о возможности ликвидации кори при условии постоянного поддержания высокого уровня охвата населения прививками.

Опыт борьбы с корью в период вакцинопрофилактики полностью подтверждает правомерность этого тезиса. Хотя корь типичная вакцинозависимая инфекция, достичь ликвидации местных случаев кори несколько труднее, чем ликвидировать оспу, прежде всего, из-за чрезвычайной высокой контагиозности кори и отсутствия выраженных клинических проявлений в период prodromы, что не позволяет своевременно изолировать источник инфекции. Более того, в силу различных причин даже после ревакцинации остается небольшое число восприимчивых к вирусу кори лиц, что приводит к постепенному накоплению восприимчивой к вирусу кори когорты населения. Именно поэтому основными критериями элиминации кори является показатель заболеваемости менее 1 случая на 1 млн населения (т.е. случаи кори в период элиминации допускаются), не более двух генераций вируса в очаге, а также отсутствие в стране эндемичного для данной территории генотипа вируса кори.

В 2012 году для контроля за ходом реализации Программы элиминации кори и краснухи в Европейском регионе создана Региональная комиссия по верификации элиминации кори и краснухи, которая ежегодно рассматривает и оценивает ход выполнения программы в каждой стране. Для унификации представления материалов ЕРБ ВОЗ в 2014 году разработало рекомендации

«Элиминация кори и краснухи: Основы процесса верификации в Европейском регионе ВОЗ», в которых подчеркнуто, что ключевыми компонентами стандартизованной оценки для подтверждения прекращения эндемической циркуляции вирусов кори и краснухи в стране должны являться: детальная информация об эпидемиологии кори и краснухи, результаты вирусологического надзора с использованием методов молекулярной эпидемиологии, анализ когорт иммунизированных групп населения, качество надзора и устойчивость национальной программы иммунизации. Планируется, что анализ и оценка ежегодных национальных отчетов будет осуществляться в каждой стране в течение, по крайней мере, трех лет после того, как Региональная комиссия по верификации элиминации кори и краснухи подтвердит, что, в соответствии с установленными критериями, эндемичная циркуляция вирусов кори и краснухи была прекращена во всех государствах—членах Европейского региона.

Вполне возможно, что элиминация кори и краснухи может быть достигнута в разные сроки. В таком случае верификация этих двух событий будет произведена отдельно и в разные сроки.

Процесс элиминации кори может быть длительным, и в отдельные годы может наблюдаться подъем заболеваемости, как это наблюдается на Американском континенте, который элиминировал корь в 2010 году и в 2013 году верифицировал этот процесс. При этом, вспышки инфекции были ограничены во времени и не требовали проведения дополнительных прививочных кампаний. Достижение элиминации кори в каждой отдельно взятой стране приведет к глобальной ликвидации инфекции.

Исходя из задач Европейского региона в Российской Федерации разработана третья Программа, направленная на элиминацию кори и краснухи к 2020 году, основной задачей которой является достижение достоверно высокого уровня охвата населения прививками ЖКВ.

Поступила 23.03.16

Контактная информация: Цвиркун Ольга Валентиновна, д.м.н.,  
125212, Москва, ул.Адмирала Макарова, 10, р.т. (495)452-18-09

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

Ю.В.Останкова<sup>1</sup>, А.В.Семенов<sup>1,2,3</sup>, Х.Н.Файзуллаев<sup>4</sup>,  
Е.И.Казакова<sup>4</sup>, А.В.Козлов<sup>3</sup>, Э.И.Мусабаев<sup>4</sup>, Арег А.Томолян<sup>1,2</sup>

## МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ГЕПАТИТА В У ПАЦИЕНТОВ С ФИБРОЗОМ/ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ В УЗБЕКИСТАНЕ

<sup>1</sup>НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, <sup>2</sup>Государственный медицинский университет им. И.П.Павлова, <sup>3</sup>Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова, С.-Петербург, <sup>4</sup>НИИ вирусологии, Ташкент, Узбекистан

**Цель.** Оценить распространенность генетических вариантов вируса гепатита В у жителей из различных регионов Узбекистана, страдающих гепатитами разного генеза с различной степенью выраженности фиброза печени и циррозом. **Материалы и методы.** Материалом исследования служили плазма крови и биоптаты печени 39 пациентов с различной степенью выраженности фиброза печени и циррозом. Было применено генотипирование на основе прямого секвенирования Pre-S1/Pre-S2/S области ДНК ВГВ. **Результаты.** Вирус гепатита В был выявлен в 32 образцах из представленных 39, частота встречаемости — 82% соответственно. На основании филогенетического анализа показано, что среди обследованных больных выявлен только генотип D, преобладал вирус гепатита В субтипа D1 (84,38%) по сравнению с субтипами D2 (3,12%) и D3 (12,5%). **Заключение.**

Масштабное скринирование ВГВ в Центральной Азии позволит оценить пути распространения и время эволюционного разделения изолятов вируса. Понимание эпидемиологии инфекционного процесса важно для разработки программ по профилактике и лечению инфекции.

Журн. микробиол., 2016, № 5, С. 34—43

Ключевые слова: гепатит В, глубокое генотипирование, секвенирование, молекулярная эпидемиология, Узбекистан

*Yu. V. Ostankova<sup>1</sup>, A. V. Semenov<sup>1,2,3</sup>, Kh. N. Faizullaev<sup>4</sup>,  
E. I. Kazakova<sup>4</sup>, A. V. Kozlov<sup>3</sup>, E. I. Musabaev<sup>4</sup>, Areg A. Totolyan<sup>1,2</sup>*

## MOLECULAR-BIOLOGICAL MARKERS OF HEPATITIS B IN PATIENTS WITH LIVER FIBROSIS/CIRRHOSIS IN UZBEKISTAN

<sup>1</sup>Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, <sup>2</sup>Pavlov State Medical University, <sup>3</sup>Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russia; <sup>4</sup>Research Institute of Virology, Tashkent, Uzbekistan

*Aim.* Evaluate prevalence of genetic variants of hepatitis B viruses in population of various regions of Uzbekistan with hepatitis of various genesis and different severity levels of liver fibrosis and cirrhosis. *Materials and methods.* Blood plasma and liver biopsy from 39 patients with different severity levels of liver fibrosis and cirrhosis served as study material. Genotyping based on direct sequencing of Pre-S1/Pre-S2/S HBV DNA region was applied. *Results.* Hepatitis B virus was detected in 32 samples of the 39 provided, frequency of occurrence — 82%, respectively. Phylogenetic analysis has shown, that only genotype D was detected among the examined patients, hepatitis B virus subtype D1 predominated (84.38%) compared with D2 (3.12%) and D3 (12.5%) subtypes. *Conclusion.* Large-scale sequencing of HBV in Central Asia will allow to evaluate routes of transmission and time of evolutionary separation of virus isolates. Understanding the epidemiology of the infectious process is important for development of programs for prophylaxis and therapy of the infection.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 5, P. 34—43

Key words: hepatitis B, deep genotyping, sequencing, molecular epidemiology, Uzbekistan

## ВВЕДЕНИЕ

Гепатит В является одним из наиболее распространенных гепатотропных вирусов, передающихся при контакте с кровью или иными жидкостями организма инфицированного человека, поражающих печень и способных вызывать как острое, так и хроническое течение заболевания. Согласно ВОЗ (2012 г.) количество инфицированных вирусом гепатита В в мире составляет почти 2 млрд человек, у более чем 240 миллионов из них развивается хронический вирусный гепатит В (ХВГВ). Вирус гепатита В широко распространен во всем мире и является гиперэндемичным для многих стран Азии, Африки, Южной Европы и Латинской Америки. Наиболее высокая распространенность ВГВ показана в странах Африки к югу от Сахары и в Восточной Азии, где 5 — 10% населения хронически инфицированы. Высокие показатели хронических инфекций отмечаются также в районе Амазонки и южных регионах Центральной и Восточной Европы. На Ближнем Востоке и Индийском субконтиненте хронически инфицированы 2 — 5% населения. Низкая распространенность вируса (<2%) показана для стран Западной Европы и Северной Америки.

Клинические проявления ХВГВ многообразны и зависят в основном от

биологических свойств вируса и его взаимодействия с иммунной системой хозяина. Однако возраст инфекции, длительность заболевания, уровень вирусной нагрузки и его изменения с течением времени, мутации вируса, экологические и генетические факторы, этническая принадлежность и пол пациента могут влиять на течение заболевания. ВГВ характеризуется высокой степенью генетической гетерогенности в связи с использованием обратной транскриптазы в процессе репликации вируса. В настоящее время ВГВ подразделяют на десять генотипов, отличающихся друг от друга по составу нуклеотидных последовательностей более чем на 8%, и на 34 субтипа, для которых показано расхождение полных нуклеотидных последовательностей в 4 — 7,5% [18].

Для генотипов и субтипов ВГВ показано разное географическое распределение. Известно, что на большинстве территорий бывшего СССР преобладает ВГВ субтипа D2, также выявлен субтип A2 и в единичных случаях D3 [17]. Анализ генотипов ВГВ в Таджикистане также показал преобладание генотипа D (94,1%) по сравнению с генотипом A (5,8%) [7]. С использованием методов серотипирования и/или с применением метода ПЦР-ПДРФ с типоспецифическими праймерами было показано преобладание ВГВ генотипа D в Узбекистане (87%), в то время как генотип A встречается в Узбекистане с частотой 13% [6]. Позже при оценке программы вакцинации против гепатита В в Узбекистане было показано, что среди детей распространенность ВГВ генотипа D составляет 69%, генотипа А — 23% (в невакцинированной группе) и генотипа С — 8% (в группе вакцинированных), при этом в группе вакцинированных детей передача вируса была только перинатальной, а в группе непривитых детей преобладал горизонтальный путь инфицирования [2].

Центральной страной Средней Азии является Узбекистан, для которого, как и для всего региона, показана высокая частота встречаемости ВГВ. Распространенность положительного HBsAg среди населения Узбекистана составляет 13,3% [15]. Было показано, что в 2010 году пятое место в мире по смертности от вирусного цирроза занимает Кыргызстан, а Узбекистан и Туркменистан — седьмое и восьмое соответственно [Mokdad A.A. et al., 2014]. В связи с тем, что одним из предполагаемых путей распространения вируса является трудовая миграция жителей стран Средней Азии в другие страны и, в том числе, в Российскую Федерацию, представляется очевидной необходимость оценки молекулярно-эпидемиологической ситуации в регионе.

Определение генотипов и субтипов ВГВ важно для лучшего понимания эпидемиологических и вирусологических особенностей заболевания, а также предоставляет дополнительную информацию для принятия решения о выборе тактики противовирусной терапии. Прямое секвенирование нуклеотидной последовательности является золотым стандартом для классификации генотипов и субгенотипов ВГВ [5].

В настоящем исследовании мы применили генотипирование на основе прямого секвенирования Pre-S1/Pre-S2/S области ДНК ВГВ для оценки распространенности генетических вариантов ВГВ у жителей Узбекистана, страдающих гепатитами с выраженным фиброзом и циррозом печени, в том числе компенсированным и декомпенсированным.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования служили плазма крови и биоптаты печени 39 пациентов с различной степенью выраженности фиброза печени и циррозом. У 21 больного (54%) были выявлены клинические проявления цирроза пече-

ни по шкале Чайлд-Пью. У остальных больных выраженность фиброза превышала F2 стадию. Все больные поступили в отделение гепатологии клиники института вирусологии МЗ Республики Узбекистан в 2013 — 2015 гг. Обследуемая группа включала: 17 пациентов с ХВГВ при выявленных в крови ДНК ВГВ и HBsAg; 4 пациента с ХВГВ + D, в крови которых выявлена РНК вируса гепатита D (ВГD) и/или антитела к ВГD при отрицательной ДНК ВГВ; 2 пациентов с коинфекцией вируса гепатита С (ВГС) с ВГВ с выявленными в крови антителами к ВГС и HBsAg; 11 пациентов с ХВГС, в крови которых выявлена РНК ВГС и/или антитела к ВГС; 5 пациентов с гепатитом неясной этиологии. В группу вошли 30 мужчин и 9 женщин в возрасте от 19 до 65 лет из 13 различных городов Республики и Южного Казахстана (Чимкент, Ташкент, Наманган, Джизак, Кашкадарья, Сырдарья, Сурхондарья, Хорезм, Самарканд, Фергана, Андижан, Каракалпакстан, Бухара).

Выделение ДНК из плазмы крови и пункционных биоптатов печени проводили в соответствии с методикой, приведенной в руководстве Sambrook et al. (1989) с некоторыми модификациями.

Для ПЦР с последующим секвенированием использовали перекрывающиеся пары праймеров, совместно фланкирующие фрагмент протяженностью 1475 пар оснований (п.о.), включающий рекомендованную для генотипирования ВГВ регион Pre-S1/Pre-S2/S протяженностью 1169 п.о. область 2848 — 3182 ... 1 — 835 нт., согласно представленному в международной базе данных GenBank изоляту Mart-B47 (HE974377.1) [4].

Состав амплификационной смеси: 15 пмоль/л каждого олигопраймера, 1 ммоль/л каждого нуклеозидтрифосфата, 6,7 ммоль/л  $MgCl_2$ , 1 ед. рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы (Fermentas), буфер для Taq ДНК-полимеразы (750 ммоль/л Трис-НСl, рН 8,8), 200 ммоль/л  $(NH_4)_2SO_4$ , 0,1% (v/v) твин 20), DMSO 10% от конечного объема, 1 мкг матрицы, вода без нуклеаз до конечного объема 25 мкл. ПЦР проводили при следующих условиях: после денатурации при 95°C в течение 5 минут устанавливали 35 циклов амплификации в режиме: 95°C — 20 сек, 55°C — 58°C — 20 сек, 72°C — 60 сек; затем финальная элонгация при 72°C — 5 мин. Качество ПЦР определяли визуально в 2% агарозном геле (120 В, 40 мин; 1xTBE), окрашенном бромистым этидием.

Продукты первичной амплификации и секвенирующей реакции очищали по методике, рекомендованной для Qiaquick PCR Purification kit (Qiagen, Germany). Для анализа качества очищения осадок растворяли в 30 мкл ТЕ-буфера и визуализировали в агарозном геле. Концентрацию НК измеряли на флуориметре Qubit 2.0 по стандартной методике. Очищенный фрагмент с концентрацией 50 — 100 нг использовали для постановки секвенирующих реакций с прямого и обратного праймеров с использованием набора Genome Lab DTCS-Quick Start Kit (Beckman Coulter Inc., USA). Для анализа продукта секвенирующей реакции очищенный осадок растворяли в SLS-буфере и помещали в генетический анализатор GenomeLab GeXP (Beckman Coulter Inc., USA).

Первичный анализ полученного фрагмента проводили с помощью программы NCBI Blast в сравнении с нуклеотидными последовательностями, представленными в международной базе данных GenBank. Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе MEGA версия 5, используя алгоритм ClustalW. Для построения филогенетических деревьев использовали метод UPGMA, bootstrap N=500 [Tamura K. et al., 2011].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ВГВ был выявлен в 32 образцах из представленных 39, частота встречаемости 82% соответственно. Для всех выявленных образцов была получена нуклеотидная последовательность Pre-S1/Pre-S2/S региона удовлетворительного качества, пригодная для дальнейшего анализа.

Для всех образцов были определены генотип и субтип. На основании филогенетического анализа 32 изолятов показано, что среди обследованных больных, у которых хронический гепатит сопровождался выраженным фиброзом и циррозом печени, был выявлен только генотип D, являющийся наиболее распространенным генотипом ВГВ в Центральной Азии. При этом преобладал ВГВ субтипа D1 (84,38%) по сравнению с ВГВ субтипа D2 (3,12%) и субтипа D3 (12,5%) (рис. 1). При анализе последовательностей фрагмента нуклеотидная идентичность в группе составила  $97,65 \pm 0,4\%$ .

Показано, что половая принадлежность не относится к значимыми факторам для распределения субтипов ВГВ в обследованной группе, однако может

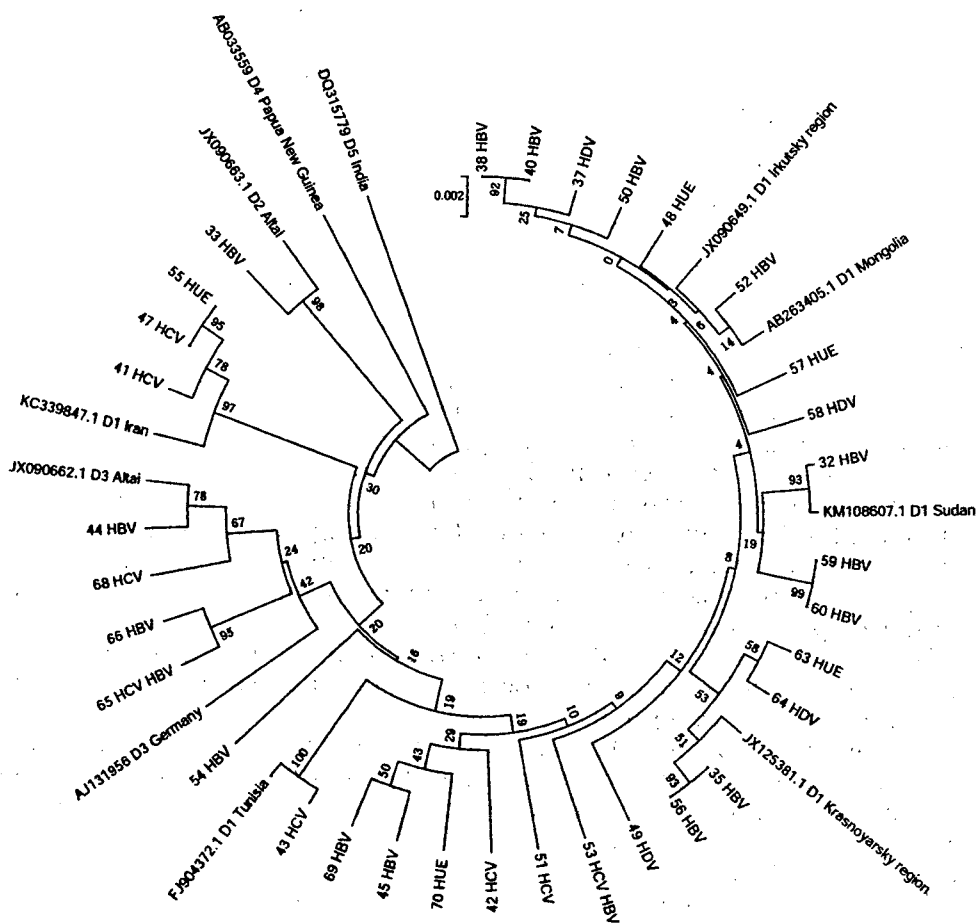


Рис. 1. Дендрограмма, характеризующая филогенетические отношения изолятов ВГВ, выделенных в Узбекистане от пациентов с гепатитами различного генеза с выраженным фиброзом и циррозом печени, в сравнении с представленными в GenBank последовательностями максимально идентичных штаммов ВГВ из других регионов мира.

быть показательным тот факт, что в составе группы, то есть среди обратившихся в клинику в тяжелом состоянии, количество мужчин более чем в три раза превышало количество женщин. Отсутствовала связь генотипа вируса и географического региона Узбекистана. Так, например, пациенты с ВГВ субтипа D3, внутригрупповой процент нуклеотидной идентичности которых составил более 99%, происходили из разных регионов республики: Ташкента, Бухары, Намангана, Чимкента. Что подтверждает связь распространенности тех или иных генотипов и/или субтипов в различных группах с путями передачи, а не с географической близостью.

Выявление в исследуемой группе только ВГВ генотипа D в противоположность ранее показанному в Узбекистане распространению не только генотипа D (77,5%), но также A (15%) и C (7,5%) [1], имеет, вероятно, несколько причин. Одной из них может быть отбор в обследуемую группу пациентов с тяжелыми заболеваниями печени. ВГВ генотипа D способен вызывать более серьезные заболевания, в том числе коррелирует с более тяжелыми заболеваниями печени, и более высокий уровень лекарственной устойчивости по сравнению с другими генотипами этого вируса [8]. При этом известно, что для ВГВ субтипа D1, преобладающего в данной группе, характерна низкая вирусная нагрузка и ранняя сероконверсия HBeAg, что может создавать проблемы для своевременного выявления вируса у пациентов и, в свою очередь, приводить к развитию более тяжелого заболевания печени [11].

В качестве второй причины можно рассматривать введение в 1998 г. вакцинации против гепатита В в Узбекистане. Как уже было сказано выше, оценка результатов вакцинации показала, что в группе вакцинированных детей был распространен только ВГВ субтипа С, причем перинатальным путем передачи вируса. Для невакцинированных был показан горизонтальный путь распространения ВГВ субтипов D и A [2]. В исследуемой нами группе были взрослые люди, родившиеся до введения программы иммунизации, вероятно всего, инфицированные горизонтальным путем передачи вируса, и, очевидно, это также может быть составной частью причины, по которой в исследованной нами группе представлен ВГВ только субтипа D. Еще одной причиной может быть эндемичность ВГВ генотипа D, для субтипов которого показано «прибытие» общего предка из Индии в Центральную Азию, а затем распространение субтипов D1-D3 из Центральной Азии в Европу и Средиземноморье [19].

Следует отметить, что в исследуемой нами группе представлены несколько попарно идентичных штаммов, мы сочли необходимым пристальнее рассмотреть и проанализировать такие пары.

Для этого проводили ПЦР с дополнительными парами праймеров и получали фрагмент общей протяженностью 2274 п.о., включающий Pre-S1/Pre-S2/S регион и регион Core-гена.

Идентичные по региону Pre-S1/Pre-S2/S изоляты 59 и 60 были получены от братьев, что объясняет высокое сходство нуклеотидных последовательностей. При углубленном анализе было выявлено единственное однонуклеотидное отличие у данных изолятов. Вероятнее всего, источник инфицирования в данном случае был общим.

При углубленном попарном анализе изолятов 35 и 56, а также 47 и 55, полученных от пациентов из разных городов проживания, были выявлены различия в Core-области. Нуклеотидная идентичность в парах составила 99% при 16 отличающихся нуклеотидных точках и 98% при 50 отличающихся нуклеотидных точках соответственно.

Однако при анализе изолятов 38 и 40, полученных от пациентов мужского



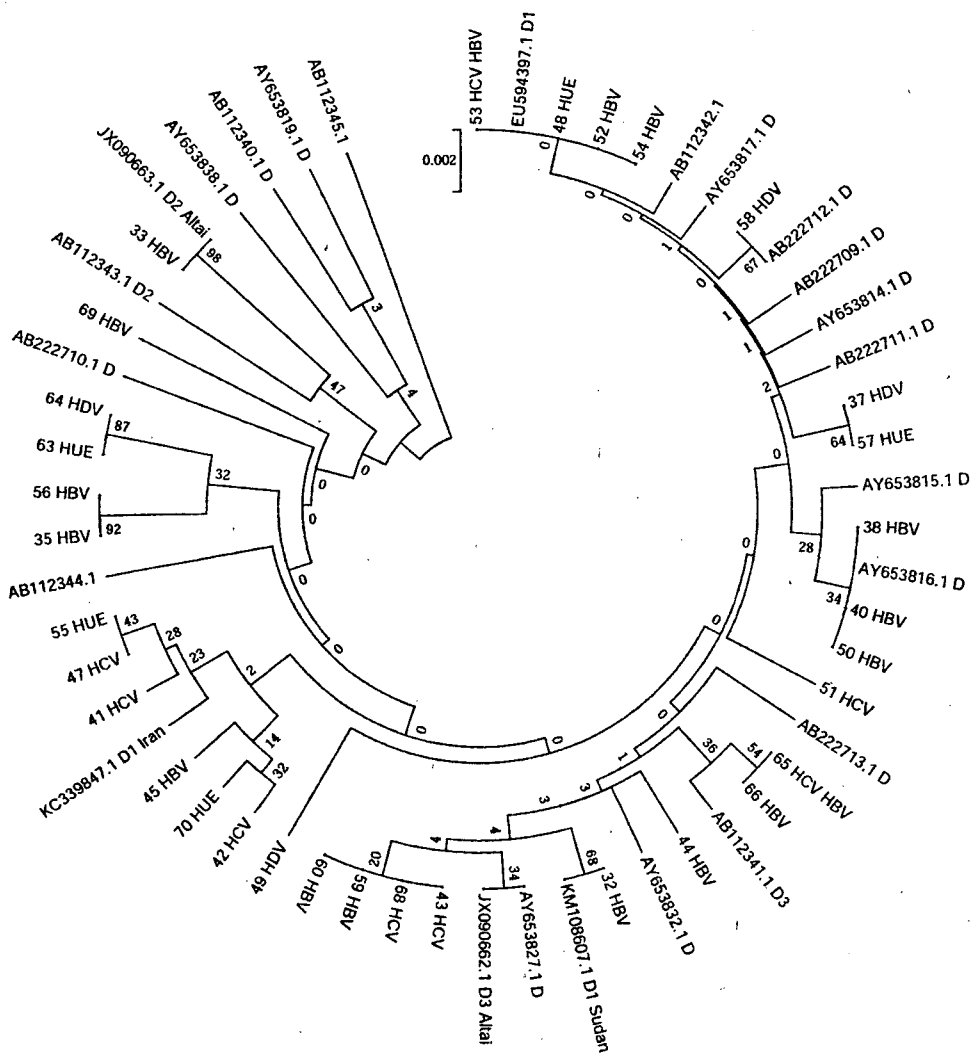


Рис. 2. Дендрограмма, характеризующая филогенетические отношения изолятов ВГВ генотипа D из Узбекистана в сравнении с представленными в GenBank последовательностями ранее полученных изолятов ВГВ.

пола одного возраста (34 года) из одного географического объекта (г. Кашкардаря), поступивших в клинику института вирусологии практически одновременно, была показана идентичность по нуклеотидному составу, несмотря на углубленный анализ. Вышеупомянутые факты, а также представленные в эпиданамнезе данные о том, что один из пациентов употребляет инъекционные наркотики, позволяют нам предположить инъекционный путь передачи вируса у этих больных. Кроме того, очевидна высокая вероятность распространения инфекции среди употребляющих наркотики людей из данного региона.

Ранее была показана возможность высокого сходства и даже идентичности нуклеотидных последовательностей фрагмента Pre-S1/Pre-S2/S и образование

тесных кластеров многочисленными изолятами, выявленными в разные годы в географически отдаленных регионах [13]. Секвенирование полного генома таких изолятов в большинстве случаев позволяло разделить их. Тем не менее, выявление почти идентичных изолятов в пределах субтипа у больных, в том числе из отдаленных географических регионов, может свидетельствовать о поздних эпидемиологических связях [16], а также подразумевать общее происхождение изолятов. В связи с этим, в данном случае мы можем предполагать общий источник инфицирования.

При сравнительном филогенетическом анализе изолятов, выявленных в нашей работе, и изолятов из Узбекистана, представленных в международной базе данных GenBank, показано высокое сходство ВГВ генотипа D (рис. 2).

Сравнение проводилось по укороченному фрагменту нуклеотидных последовательностей, соответственно с длиной образцов, представленных в GenBank. При этом обращает на себя внимание близкое сходство ВГВ субтипов D1 и D3.

Таким образом, высокое сходство нуклеотидных последовательностей выявленных нами изолятов ВГВ у пациентов в группе с гепатитом с выраженным фиброзом и циррозом печени с описанными ранее штаммами показывает эндемичность представленных субтипов для данного региона.

Среди обследованных нами пациентов обращает на себя внимание группа больных с оккультным ВГВ, отличительной чертой которого, как известно, является негативный HBsAg в сыворотке крови, а также низкий уровень вирусной ДНК в плазме крови и печени.

При использовании общепринятых методов анализа с помощью коммерческих наборов у 11 пациентов с ХВГС и у 5 пациентов с диагнозом гепатита неясной этиологии не выявлена ДНК ВГВ в плазме крови и в биоптатах. Однако нам удалось выявить кольцевую ковалентно-замкнутую ДНК ВГВ у 6 из 11 пациентов с ХВГС и у всех пациентов с гепатитом неясной этиологии. Таким образом, частота выявления ВГВ у больных ХВГС составила 54,5%, у больных с гепатитом неясной этиологии — 100% соответственно. В дальнейшем для этих образцов получена нуклеотидная последовательность Pre-S1/Pre-S2/S региона. Среди больных с оккультным ВГВ преобладал субтип D1 (91%), и только у одного человека был выявлен субтип D3 (9%).

Высокий процент обнаружения у больных ХВГС оккультного ВГВ, вероятнее всего, объясняется тем, что ВГС способен препятствовать репликации и экспрессии генов ВГВ, что становится причиной отрицательного HBsAg при анализе. При этом тяжелое состояние пациентов является подтверждением известного факта высокой частоты встречаемости и клинической значимости оккультного ВГВ у больных с ХВГС. По некоторым данным ХВГС в сочетании с оккультным ВГВ связан с повышенным риском развития цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы [3]. Кроме того, показано, что у людей с тяжелыми заболеваниями печени при отрицательном HBsAg оккультный ВГВ встречается с частотой 59%, а у больных гепатоцеллюлярной карциномой — 85% [12]. ДНК ВГВ обнаруживается в 40 — 50% биоптатов печени при хроническом HBsAg-негативном гепатите [14].

Несмотря на то, что некоторые работы показывают совпадение частот распространенности генотипов и субтипов оккультного ВГВ с распределением генотипов ВГВ в том или ином регионе, также продемонстрирована характерность преобладания генотипа D для оккультного ВГВ и более тяжелой клинической картина, чем при открытом ХВГВ [10]. Особенно показательным это продемонстрировано исследователями в Корее, где показано преобладание

в популяции ВГВ субтипа С (более 90%), но при оккультном ВГВ преобладает субтип D (75%) [9]. При этом считается, что вирус с генотипом D может быть более предрасположен к потере HBsAg, в связи с чем, высказывается предположение о селективном преимуществе генотипа D при смешанном инфицировании.

Таким образом, нельзя сказать, что выявленное нами тотальное преобладание ВГВ субтипа D1 у больных с оккультным гепатитом В коррелирует с распределением генотипов ВГВ в Узбекистане. Однако высокая частота встречаемости данного генотипа в Центральной Азии наводит на мысль о возможности широкого распространения оккультного ВГВ в регионе. Для подтверждения или опровержения данного предположения необходим широкий скрининг населения, что представляется особенно актуальным в связи с давно продемонстрированной возможностью передачи инфекции от оккультных носителей ВГВ.

Мы считаем необходимым выявить причины, по которым заражение ВГВ не было определено ранее у пациентов с ХВГС и у пациентов с гепатитом неясной этиологии. Кроме того, настораживает тот факт, что в исходной группе среди 39 пациентов были два человека с диагнозом ХВГВ, положительными HBsAg, HBeAg и ДНК ВГВ в плазме крови, у которых ни в плазме крови, ни в биоптатах печени нами не был выявлен ВГВ как при использовании стандартных методов диагностики, так и при помощи более сложных методов молекулярного анализа.

Дальнейшие молекулярные эпидемиологические исследования необходимы не только для того, чтобы прояснить данную ситуацию, но и, в первую очередь, для подбора адекватной терапии. Масштабное скринирование ВГВ в Центральной Азии позволило бы оценить пути распространения и время эволюционного разделения изолятов вируса. Понимание эпидемиологии инфекционного процесса важно для разработки программ по профилактике и лечению инфекции.

Систематическое применение молекулярной филогенетики может быть использовано для повышения качества традиционных методов надзора путем выявления инфекционных кластеров.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Даминов Т.А., Камилов А.И., Туйчиев Л.Н. и др. Клинико-эпидемиологические аспекты генотипов вируса гепатита В, встречающихся в Узбекистане. Вопросы современной педиатрии. 2003, 3 (2): 98-100.
2. Avazova D., Kurbanov F., Tanaka Y. et al. Hepatitis B virus transmission pattern and vaccination efficiency in Uzbekistan. *J. Med. Virol.* 2008, 80 (2): 217-224.
3. Branco F., Mattos A.A., Coral G.P. et al. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic liver disease due to hepatitis C virus and hepatocellular carcinoma in Brazil. *Arq. Gastroenterol.* 2007, 44 (1): 58-63.
4. Brichler S., Lagathu G., Chekarou M.A. et al. African, Amerindian and European hepatitis B virus strains circulate on the Caribbean Island of Martinique. *J. Gen. Virol.* 2013, 94 (10): 2318-2329.
5. Guirgis B.S.S., Abbas R.O., Azzazy H.M.E. Hepatitis B virus genotyping: current methods and clinical implications. *Int. J. Infect. Dis.* 2010, 14: 941-953.
6. Kato H., Ruzibakiev R., Yuldasheva N. et al. Hepatitis B virus genotypes in Uzbekistan and validity of two different systems for genotyping. *J. Med. Virol.* 2002, 67 (4): 477-483.
7. Khan A., Kurbanov F., Tanaka Y. et al. Epidemiological and clinical evaluation of hepatitis B, hepatitis C, and delta hepatitis viruses in Tajikistan. *J. Med. Virol.* 2008, 80 (2): 268-276.
8. Khedive A., Sanei-Moghaddam I., Alavian S.M. et al. Hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) mutations are rare but clustered in immune epitopes in chronic carriers from Sistan-Balouchestan Province, Iran. *Arch. Iran. Med.* 2013, 16 (7): 385-389.

9. Kim K.H., Chang H.Y., Park J.Y. et al. Spontaneous HBsAg loss in Korean patients: relevance of viral genotypes, S gene mutations, and covalently closed circular DNA copy numbers. *Clin. Mol. Hepatol.* 2014, 20 (3): 251-260.
10. Kishk R., Atta H.A., Ragheb M. et al. Genotype characterization of occult hepatitis B virus strains among Egyptian chronic hepatitis C patients. *East. Mediterr. Health. J.* 2014, 20 (2): 130-138.
11. Ozaras R., Inanc B.I., Yemisen M. et al. Epidemiology of HBV subgenotypes D. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 2015, 39 (1): 28-37.
12. Pollicino T., Saitta C. Occult hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 2014, 20: 5951-5961.
13. Ramachandran S., Purdy M.A., Xia G. et al. Recent population expansions of hepatitis B virus in the United States. *Virology.* 2014, 88 (24): 13971-13980.
14. Rizvi M., Azam M., Sultan A. et al. Prevalence of genotype D in chronic liver disease patients with occult HBV infection in northern region of India. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 2014, 57 (4): 537-541.
15. Ruzibakiev R., Kato H., Ueda R. et al. Risk factors and seroprevalence of hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus infection in Uzbekistan. *Intervirology.* 2001, 44 (6): 327-332.
16. Tallo T., Norder H., Tefanova V. et al. Hepatitis B virus genotype D strains from Estonia share sequence similarity with strains from Siberia and may specify ayw4. *J. Med. Virol.* 2004, 74: 221-227.
17. Tallo T., Tefanova V., Priimagi L. et al. D2: major subgenotype of hepatitis B virus in Russia and the Baltic region. *J. Gen. Virol.* 2008, 89: 1829-1839.
18. Yuen M.F., Lai C.L. Hepatitis B virus genotypes: natural history and implications for treatment. *Expert. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2007, 1: 321-328.
19. Zehender G., Shkjezi R., Ebranati E. et al. Reconstruction of the epidemic history of hepatitis B virus genotype D in Albania. *Infect. Genet. Evol.* 2012, 12: 291-298.

*Поступила 23.03.16*

Контактная информация: Останкова Ю.В.,  
197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14, р.т. (812)233-20-92

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*А.В.Семенов<sup>1,2,3</sup>, Ю.В.Останкова<sup>1</sup>, Х.Н.Файзуллаев<sup>4</sup>,  
Е.И.Казакова<sup>4</sup>, А.В.Козлов<sup>3</sup>, Э.И.Мусабаев<sup>4</sup>, Арег А.Тотоян<sup>1,2</sup>*

## **КОЛЬЦЕВАЯ КОВАЛЕНТНО ЗАМКНУТАЯ ДНК ВГВ КАК МАРКЕР РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ОККУЛЬТНОГО ГЕПАТИТА В У ПАЦИЕНТОВ С ВГВ, ВГД И ВГС ИНФЕКЦИЕЙ В УЗБЕКИСТАНЕ**

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, <sup>2</sup>Государственный медицинский университет им. И.П.Павлова, <sup>3</sup>Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова, С.-Петербург; <sup>4</sup>НИИ вирусологии, Ташкент, Узбекистан

*Цель.* Оценить значимость кольцевой ковалентно замкнутой ДНК вирусного гепатита В в качестве маркера для выявления оккультного вирусного гепатита В у жителей Узбекистана, страдающих гепатитами разного генеза. *Материалы и методы.* Материалом исследования служили плазма крови и биоптаты печени 39 пациентов с различной степенью выраженности фиброза печени и циррозом. Выявление кольцевой ковалентно замкнутой ДНК ВГВ проводили согласно методике Pollicino T. et al. (2004). *Результаты.* Кольцевая ковалентно замкнутая ДНК вирусного гепатита В была выявлена в 82% образцах, в том числе, у 54,5% пациентов с хроническим вирусным гепатитом С (ХВГС) и у 100% пациентов с гепатитом неясной этиологии. При количественной оценке содержания кольцевой ковалентно замкнутой ДНК вирусного гепатита В в тканях печени у пациентов с ХВГВ было показано в среднем 2,5 копии генома ВГВ в виде ккз ДНК на клетку, у пациентов с ХВГВ + D в среднем 0,7 копий/клетку, у пациентов с коинфекцией ВГС + ВГВ

0,5 копий/клетку, у пациентов с ХВГС в среднем 0,12 копий/клетку, у пациентов с криптогенным гепатитом 0,2 копий/клетку. *Заключение.* Обнаружение ДНК ВГВ представляет собой сложную задачу для эффективной лабораторной диагностики гепатита. Выявление ккз ДНК ВГВ как маркера оккультного гепатита В у больных с ХВГС и пациентов с гепатитом неясной этиологии представляется важным фактором для диагностики, подбора адекватной терапии, прогнозирования исхода заболевания и предотвращения развития тяжелых заболеваний печени.

Журн. микробиол., 2016, № 5, С. 43—49

Ключевые слова: оккультный гепатит В, ккз ДНК, криптогенный гепатит, секвенирование, Узбекистан

*A.V.Semenov*<sup>1,2,3</sup>, *Yu.V.Ostankova*<sup>1</sup>, *Kh.N.Faizullaev*<sup>4</sup>,  
*E.I.Kazakova*<sup>4</sup>, *A.V.Kozlov*<sup>3</sup>, *E.I.Musabaev*<sup>4</sup>, *Areg A.Totolyan*<sup>1,2</sup>

## HBV COVALENTLY CLOSED CIRCULAR DNA AS A MARKER OF PREVALENCE OF OCCULT HEPATITIS B IN PATIENTS WITH HBV, HDV AND HCV INFECTION IN UZBEKISTAN

<sup>1</sup>Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, <sup>2</sup>Pavlov State Medical University, <sup>3</sup>Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russia; <sup>4</sup>Research Institute of Virology, Tashkent, Uzbekistan

*Aim.* Evaluate significance of covalently closed circular DNA of hepatitis B virus as a marker for detection of occult viral hepatitis B in Uzbekistan population with hepatitis of various genesis. *Materials and methods.* Blood plasma and liver biopsy from 39 patients with different severity levels of liver fibrosis and cirrhosis served as study material. HBV covalently closed circular DNA detection was carried out according to Pollicino T. et al. (2004). *Results.* Covalently closed circular DNA of hepatitis B virus was detected in 82% of samples, including in 54.5% of patients with chronic viral hepatitis C (CVHC) and in 100% of patients with hepatitis of unknown etiology. Quantitative evaluation of content of covalently closed circular DNA of hepatitis B virus in liver tissue in patients with CVHB has shown an average of 2.5 copies of HBV genome as ccc DNA per cell, in patients with CVHB + D an average of 0.7 copies/cell, in patients with co-infection by HCV and HBV — 0.5 copies/cell, in patients with CVHC an average of 0.12 copies/cell, and in patients with cryptogenic hepatitis — 0.2 copies/cell. *Conclusion.* Detection of HBV DNA is a complex problem for effective laboratory diagnostics of hepatitis. Detection of HBV ccc DNA as a marker of occult hepatitis B in patients with CVHC and patients with hepatitis of unclear etiology is an important factor for diagnostics, selection of adequate therapy, prognosis of disease outcome and prevention of development of severe liver diseases.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 5, P. 43—49

Key words: occult hepatitis B, ccc DNA, cryptogenic hepatitis, sequencing, Uzbekistan

## ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее распространенных гепатотропных вирусов, поражающих печень и способных вызывать как острое, так и хроническое течение заболевания, является вирус гепатита В (ВГВ). Хронический вирусный гепатит В (ХВГВ) — основная причина тяжелых заболеваний печени, включая цирроз и гепатоцеллюлярную карциному, от которых ежегодно умирают более 780 000 человек [9]. Хронизация ВГВ происходит у 90% детей, инфицированных при рождении, 25 — 50% детей, инфицированных в 1 — 5 лет и 1 — 5% людей, инфицированных в старшем детском и зрелом возрасте. Более чем у 20% заразившихся в зрелом возрасте больных развивается цирроз или рак печени, при этом наличие поверхностного антигена ВГВ (HBsAg) и его уровень в сы-

воротке являются основными маркерами, используемыми в диагностике и прогнозе ХВГВ, а также в оценке риска развития данных заболеваний.

В то же время, одной из форм естественного течения ХВГВ является оккультный гепатит В, характеризующийся сохранением ДНК ВГВ в печени и значительно реже в периферической крови пациентов с негативным НВsAg. Предполагают, что механизм данного явления связан с длительным сохранением в ядрах гепатоцитов кольцевой ковалентно замкнутой (ккз) ДНК ВГВ, способной становиться матрицей для субгеномных и прегеномных копий РНК, на основе которых синтезируется вирусный геном и вирусные белки [7]. При этом, в большинстве случаев репликация вируса и экспрессия генов могут быть подавлены настолько, что вирусная нагрузка в периферической крови больного крайне низка, вплоть до невозможности выявить ДНК ВГВ стандартными методами, но элиминации вируса при подавлении репликации не происходит. Несмотря на отсутствие в периферической крови НВsAg, большинство пациентов с оккультным гепатитом В являются серопозитивными по одному или нескольким серологическим маркерам — в зависимости от фазы течения заболевания анти-НВs, НВеAg, анти-НВе, анти-НВсog. Однако более 20% больных серонегативны по всем маркерам ВГВ [17].

Распространенность оккультного ВГВ в мире варьирует, однако это может быть связано не только с биологическими особенностями вируса и частотой встречаемости ВГВ на той или иной территории, но и с методом выявления вируса.

Согласно данным литературы, оккультный ВГВ может сопровождать заболевания печени, имеющие иные причины, например безалкогольный стеатогепатоз, аутоиммунный гепатит, хронический вирусный гепатит С (ХВГС) и другие [14]. При этом оккультный ВГВ может играть существенную роль в развитии фиброза печени и гепатоцеллюлярной карциномы [11].

Как известно, почти 30% хронических вирусных гепатитов остаются не выявленными. Немалую долю среди них занимают пациенты с тяжелыми заболеваниями печени, этиологию которых не удается определить. Было показано, что более чем 8% пациентов с криптогенным гепатитом инфицированы ВГВ в скрытой форме [13]. Для пациентов с аутоиммунным гепатитом частота встречаемости оккультного ВГВ составила 13%, с первичным билиарным циррозом — 8%, с первичным склерозирующим холангитом — 18% [6]. Однако при тяжелых заболеваниях печени неясной этиологии, предположительно связанных с алкогольным гепатитом, неалкогольным стеатогепатитом, а также с наследственными причинами, частота встречаемости оккультного ВГВ была значительно выше. Так, например, в группе пациентов с криптогенной холангиокарциномой оккультный ВГВ был выявлен у 63%, а в группе с гепатоцеллюлярной карциномой — у 68% больных [13].

Кроме того, было отмечено, что из-за общих путей передачи оккультный гепатит В часто встречается среди пациентов, инфицированных вирусом гепатита С (ВГС) с прогрессирующим заболеванием печени, даже в районах, не эндемичных по ВГВ [11]. Так, например, в странах Средиземноморья ккз ДНК ВГВ показано для трети НВsAg-негативных больных ХВГС [11], а в странах Восточной Азии — для 50% больных [5]. При этом повышенная распространенность случаев с прогрессирующим заболеванием печени у больных ХВГС с оккультным ВГВ по сравнению с больными без ко-инфекции одними исследователями подтверждается, другими опровергается. Тем не менее, взаимная вирусная интерференция может привести к ухудшению функции печени и к низкой выживаемости пациентов [16].

Возможно, одной из основных причин противоречий является неоднородность методов, используемых для обнаружения оккультного ВГВ. Золотым стандартом является обнаружение ДНК ВГВ в гепатоцитах с использованием специфических высокочувствительных методов. Несмотря на многочисленные работы, как подтверждающие значимость ккз ДНК ВГВ в развитии заболевания, так и противоречащие этому, недостаточно исследований, использующих этот единственный надежный диагностический маркер, особенно в РФ и странах СНГ [2]. Данное обстоятельство связано с рядом этических и методических ограничений, таких как инвазивный характер морфологического исследования печени и отсутствие конкретных количественных методов для выявления ккз ДНК ВГВ в пункционных биоптатах печени.

Одним из эндемичных по вирусным гепатитам регионов является Средняя Азия. Распространенность положительного HBsAg среди населения Узбекистана составляет 13,3%, а anti-HCV — 13,1% [15].

Целью нашего исследования было оценить значимость ккз ДНК ВГВ в качестве маркера для выявления оккультного ВГВ у жителей Узбекистана, страдающих гепатитами различного генеза.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования служила плазма крови и биоптаты печени 39 пациентов с различной степенью выраженности фиброза печени и циррозом. Все пациенты дали письменное информированное согласие на участие в исследовании. У 21 больного (54%) были выявлены клинические проявления цирроза печени по шкале Чайлд-Пью. У остальных больных выраженность фиброза превышала F2 стадию. Все больные поступили в отделение гепатологии клиники института вирусологии МЗ Узбекистана в 2013 — 2015 гг. Обследуемая группа включала: 17 пациентов с ХВГВ при выявленных в крови HBsAg и/или ДНК ВГВ; 4 пациента с ХВГВ + D, в крови которых выявлена РНК ВГД и/или антитела к ВГД при отрицательной ДНК ВГВ; 2 пациентов с коинфекцией ВГС + ВГВ с выявленными в крови антителами к ВГС и HBsAg; 11 пациентов с ХВГС, в крови которых выявлена РНК ВГС и/или антитела к ВГС; 5 пациентов с гепатитом неясной этиологии. В группу вошли 30 мужчин и 9 женщин в возрасте от 19 до 65 лет из 13 различных городов Республики и Южного Казахстана (Чимкент, Ташкент, Наманган, Джизак, Кашкадарья, Сырдарья, Сурхондарья, Хорезм, Самарканд, Фергана, Андижан, Каракалпастан, Бухара).

Для первичного выявления ВГВ из плазмы крови выделяли нуклеиновые кислоты (НК) с использованием коммерческого набора «АмплиПрайм Рибо-преп» (ЦНИИЭ, Москва). Во избежание ложноотрицательного результата при низкой вирусной нагрузке для всех образцов проводили предварительное концентрирование вируса ультрацентрифугированием плазмы крови в течение 1 часа при 24 000 g, 4°C. Анализ присутствия вируса осуществляли методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени с помощью коммерческого набора «АмплиСенс® HBV-FL» (ЦНИИЭ, Москва).

Для углубленного анализа проводили выделение НК из плазмы крови и пункционных биоптатов печени в соответствии с методикой, приведенной в руководстве Sambrook J. et al. (1989) с некоторыми модификациями.

Выявление кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК ВГВ проводили согласно [10] с использованием TaqMan зондов для real-time ПЦР. Предварительно ДНК обрабатывали эндонуклеазой Mung Bean (Сибэнзим) из расчета 1 ед.

фермента на 1 мкг ДНК для удаления одноцепочечных ДНК и РНК и расщепления геномной ДНК ВГВ (частично-кольцевой). Для каждого образца реакцию проводили в трех повторах, далее усредняли значение  $C_t$  для них. Анализ результатов осуществляли по методу относительного подсчета (метод дельта  $C_t$ ) с нормализацией по эндогенному референс гену GAPDH (глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа). Для оценки эффективности реакции для каждого гена делали серию разведений образца. Эффективность реакции автоматически рассчитывалась прибором. Использовали следующие праймеры: ВГВ fp23 5-ctgaatcctgcggacgaccc-3, ВГВ fp24 5-cccaaggcacagcttg-gagg-3, ВГВ fp25b 5-gtctgtgccttctcatctgcc-3, ВГВ fp26b 5-agagatgattaggcagaggtg-3, ВГВ probeTaqMan ROX-tgtgcacttcgcttcacctctgc-BHQ2. В качестве внутреннего контроля использовали ген домашнего хозяйства GAPDH: GAPDH-fp 5-atct-tccaggagtgagcgag-3, GAPDH-rp 5-gactccacgacgtactcagc-3, GAPDH-ProbeTaqMan FAM-tccaaaatcaagtggggcgatg-BHQ1. Подбор условий и выполнение исследования проводили на приборе CFX96 (Bio-Rad).

С целью подтверждения наличия ВГВ использовали необработанную эндонуклеазой ДНК в качестве матрицы для ПЦР с дальнейшим секвенированием.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При использовании общепринятых методов анализа с помощью коммерческих наборов маркеры ВГВ были выявлены у 15 пациентов с ХВГВ, 4 пациентов с ХВГВ + D, 2 пациентов с коинфекцией ВГС + ВГВ. У 11 пациентов с диагнозом ХВГС и у 5 пациентов с криптогенным гепатитом маркеры ВГВ, включая ДНК ВГВ в плазме крови и биоптатах, выявлены не были. Частота встречаемости маркеров гепатита В в крови у обследованных больных — 53,8 %.

Кольцевая ковалентно замкнутая ДНК ВГВ была выявлена в 32 образцах из представленных 39 — частота встречаемости 82% соответственно, в том числе у 6 из 11 пациентов с диагнозом ХВГС и у всех пациентов с гепатитом неясной этиологии. Таким образом, частота выявления оккультного ВГВ у больных ХВГС составила 54,5%, у больных с криптогенным гепатитом — 100% соответственно.

При количественной оценке содержания ккз ДНК ВГВ в тканях печени у пациентов с ХВГВ было показано в среднем 2,5 копии/клетку (от 0,9 до 2,7 копий генома ВГВ в виде ккз ДНК на клетку), у пациентов с ХВГВ + D в среднем 0,7 копий/клетку (от 0,5 до 1,0 копий генома ВГВ в виде ккз ДНК на клетку), у пациентов с коинфекцией ВГС + ВГВ — 0,5 и 0,4 копий/клетку, у пациентов с предварительным диагнозом ХВГС — в среднем 0,12 копий/клетку (от 0,03 до 0,2 копий генома ВГВ в виде ккз ДНК на клетку), у пациентов с криптогенным гепатитом — 0,2 копий/клетку (от 0,05 до 0,3 копий генома ВГВ в виде ккз ДНК на клетку).

Следует отметить, что распространенность ВГС и ВГВ в Узбекистане в среднем превышает 13% [15]. Так как ВГВ и ВГС имеют сходные факторы риска и пути передачи, выявление оккультного ВГВ у пациентов с ХВГС не удивительно. Инфицирование двумя вирусами одновременно или последовательно часто встречается в регионах, эндемичных по вирусным гепатитам. Высокий процент обнаружения у больных ХВГС оккультного ВГВ, вероятнее всего, объясняется способностью ВГС препятствовать репликации и экспрессии генов ВГВ.

При этом тяжелое состояние наших пациентов согласуется с данными иностранных коллег, показавших, что наличие оккультного ВГВ у больных ХВГС коррелирует с развитием более продвинутой патологии печени в виде



фиброза и цирроза с более тяжелым клиническим течением заболевания (декомпенсированный цирроз) и со снижением ответа на интерферон альфа [17], что может становиться причиной негативного влияния на исход заболевания [4].

Ранее в наших работах была показана прямая корреляция между уровнем ккз ДНК в тканях печени и количественным содержанием HBsAg в сыворотке периферической крови пациентов с ХВГВ. При этом у пациентов с ХВГВ в группе с умеренной активностью инфицирован практически каждый гепатоцит (в среднем 1,7 копий/клетку, то есть от 0,3 до 2 копий генома ВГВ в виде ккз ДНК на клетку), а в группе с разными фазами естественного течения заболевания — иммунного контроля и реактивации — нет различий в уровнях ккз ДНК ВГВ (в среднем 1,02 копий/клетку), в то время как у неактивных носителей HBsAg уровень ккз ДНК в среднем 0,15 копий/клетку [1, 2]. Таким образом, полученные нами результаты о высоком уровне ккз ДНК ВГВ у больных ХВГВ с различной степенью выраженности фиброза и циррозом печени и, напротив, значительно более низком соотношении инфицированных и неинфицированных клеток печени у больных с сопутствующими инфекциями, в том числе HBsAg-негативных, согласуются как с ранними нашими исследованиями, так и с работами коллег, показавших низкий уровень репликации ВГВ при совместном инфицировании с ВГС и ВГД. Это может служить подтверждением ранее высказанного мнения Alghamdi et al. [3], согласно которому уровень HBsAg в крови, коррелируя с содержанием ДНК ВГВ в печени, отражает не ее абсолютное количество, а транскрипционно-активную ккз ДНК ВГВ. При этом отсутствие HBsAg в сыворотке, вероятно, демонстрирует низкую концентрацию ккз ДНК ВГВ в ткани печени.

Выявление оккультного ВГВ у всех пациентов с криптогенным гепатитом является, по всей видимости, следствием малой выборки. Мы предполагаем, что при увеличении группы больных частота распространенности оккультного ВГВ у таких пациентов уменьшится, но, тем не менее, будет достаточно высока. Это предположение косвенно подтверждается результатами работ иностранных коллег, согласно которым в высокоэндемичных по вирусному гепатиту регионах у людей с тяжелыми заболеваниями печени при отрицательном HBsAg оккультный ВГВ встречается с частотой 59%, а у больных гепатоцеллюлярной карциномой — до 85% [8], [Pollicino T. et al., 2014].

При этом, низкий уровень ккз ДНК ВГВ в печени пациентов с криптогенным гепатитом, по сравнению с уровнем у больных ХВГВ, не противоречит данным других исследователей [Wong D.K. et al., 2015].

Обнаружение ДНК ВГВ представляет собой сложную задачу для эффективной лабораторной диагностики гепатита, особенно там, где ПЦР не принята в качестве одного из скрининговых методов выявления ВГВ, что актуально для высокоэндемичных по вирусным гепатитам регионов. Высокий процент встречаемости оккультного ВГВ у больных ХВГС и, особенно, у больных с неясной этиологией заболевания печени свидетельствует о недостаточности для выявления ХВГВ общепринятых анализов на HBsAg и ДНК ВГВ в периферической крови с использованием коммерческих наборов. Выявление ккз ДНК ВГВ как маркера оккультного ВГВ у больных с ХВГС и пациентов с гепатитом неясной этиологии представляется важным фактором для диагностики, подбора адекватной терапии, прогнозирования исхода заболевания и предотвращения развития тяжелых заболеваний печени.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Габдрахманов И.А., Семенов А.В., Останкова Ю.В. и др. Взаимосвязи вирусологических и морфологических показателей в фазах иммунного контроля и реактивации у больных хроническим гепатитом В. Журнал инфектологии. 2015, 7 (4): 37-43.
2. Семенов А.В., Власова И.А., Останкова Ю.В., Тотолян Арег А. Количественное определение HBsAg в сыворотке крови и кольцевой ковалентно замкнутой ДНК вируса гепатита В в ткани печени как маркеры активности хронического вирусного гепатита В. Журн. микробиол. 2014, 1: 55-61.
3. Alghamdi A., Aref N., El-Hazmi M. et al. Correlation between hepatitis B surface antigen titers and HBV DNA levels. Saudi J. Gastroenterol. 2013, 19 (6): 252-257.
4. Branco F., Mattos A.A., Coral G.P. et al. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic liver disease due to hepatitis C virus and hepatocellular carcinoma in Brazil. Arq. Gastroenterol. 2007, 44 (1): 58-63.
5. Fukuda R., Ishimura N., Niigaki M. et al. Serologically silent hepatitis B virus coinfection in patients with hepatitis C virus-associated chronic liver disease: clinical and virological significance. J. Med. Virol. 1999, 58: 201-207.
6. Georgiadou S.P., Zachou K., Liaskos C. et al. Occult hepatitis B virus infection in patients with autoimmune liver diseases. Liver Int. 2009, 29 (3): 434-442.
7. Guo J.T., Guo H. Metabolism and function of hepatitis B virus cccDNA: Implications for the development of cccDNA-targeting antiviral therapeutics. Antiviral Research. 2015, 122: 91-100.
8. Huang X., Hollinger F.B. Occult hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma: a systematic review. J. Viral Hepat. 2014, 21: 153-162.
9. Lozano R., Naghavi M., Foreman K. et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. Lancet. 2012, 380: 2095-2128.
10. Pollicino T., Squadrito G., Cerenzia G. et al. Hepatitis B virus maintains its pro-oncogenic properties in the case of occult HBV infection. Gastroenterology. 2004, 126 (1): 102-110.
11. Raimondo G., Pollicino T., Cacciola I. et al. Occult hepatitis B virus infection. J. Hepatol. 2007, 46: 160-170.
12. Ramezani A., Banifazl M., Eslamifar A. et al. Occult hepatitis B infection in different high risk patients. Hepat. Mon. 2012, 12: 467-468.
13. Rizvi M., Azam M., Sultan A. et al. Prevalence of genotype D in chronic liver disease patients with occult HBV infection in northern region of India. Indian J. Pathol. Microbiol. 2014, 57 (4): 537-541.
14. Rodriguez-Inigo E., Bartolome J., Ortiz-Movilla N. et al. Hepatitis C virus (HCV) and hepatitis B virus (HBV) can coinfect the same hepatocyte in the liver of patients with chronic HCV and occult HBV infection. J. Virol. 2005, 79 (24): 15578-15581.
15. Ruzibakiev R., Kato H., Ueda R. et al. Risk factors and seroprevalence of hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus infection in Uzbekistan. Intervirology. 2001, 44 (6): 327-332.
16. Squadrito G., Cacciola I., Alibrandi A. et al. Impact of occult hepatitis B virus infection on the outcome of chronic hepatitis C. J. Hepatol. 2013, 59 (4): 696-700.
17. Torbenson M., Thomas D.L. Occult hepatitis B. Lancet Infect. Dis. 2002, 2: 479-486.
18. Wu Z.F., Xu Z., Li W.S. et al. Impact of occult hepatitis B virus infection on outcome after resection for non-B non-C hepatocellular carcinoma. J. Surg. Res. 2015, 193 (1): 153-160.

*Поступила 23.03.16*

Контактная информация: Останкова Ю.В.,  
197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14, р.т. (812)233-20-92

И.А. Чагина<sup>1</sup>, О.Ю. Борисова<sup>1,2</sup>, Л.И. Кафарская<sup>2</sup>, С.С. Афанасьев<sup>1</sup>,  
В.А. Алешкин<sup>1</sup>, Ю.В. Несвижский, М.С. Афанасьев<sup>3</sup>, А.В. Алешкин<sup>1</sup>,  
Е.В. Юсуф<sup>4</sup>, Т.И. Москвина<sup>5</sup>, Л.И. Пономарева<sup>6</sup>, А.В. Караулов<sup>3</sup>

## СОСТАВ ПОПУЛЯЦИИ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ДИФТЕРИИ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В РОССИИ

<sup>1</sup>Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, <sup>2</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, <sup>3</sup>Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва; <sup>4</sup>Центр гигиены и эпидемиологии в Ханты-Мансийском автономном округе Югре, Ханты-Мансийск; <sup>5</sup>Центр гигиены и эпидемиологии в Челябинской области, Челябинск; <sup>6</sup>Центр гигиены и эпидемиологии в республике Удмуртия, Ижевск

**Цель.** Характеристика клонального состава популяции штаммов *Corynebacterium diphtheriae* в России с помощью MLST, а также оценка возможности использования этого метода при проведении мониторинга штаммов возбудителя дифтерийной инфекции. **Материалы и методы.** Изучены штаммы *C. diphtheriae*, выделенные в России в 1957 — 2015 гг. и присланные в референс-центр по дифтерии и коклюшу МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского. Генотипирование *C. diphtheriae* с помощью MLST проводили на основе секвенирования фрагментов генов «домашнего хозяйства». Идентификацию ST осуществляли согласно PubMLST. **Результаты.** На территории России идентифицированы штаммы *C. diphtheriae* 36 сиквенс-типов (ST) — 27 ранее известных и 9 новых, выявленных нами впервые. Доминирующими были 2 сиквенс-типа ST25 и ST8 (22% и 18%). Показана взаимосвязь между фенотипическими свойствами (токсигенность и биовар) и принадлежностью штаммов *C. diphtheriae* к определенному сиквенс-типу — токсигенные и нетоксигенные штаммы *C. diphtheriae* различных биоваров характеризовались определенными сиквенс-типами. Показаны изменения клонального состава популяции *C. diphtheriae* в динамике эпидемического процесса дифтерийной инфекции. **Заключение.** Использование MLST позволило охарактеризовать клональный состав популяции штаммов *C. diphtheriae* в России и показало перспективность применения этого метода для характеристики популяции возбудителя дифтерии, выявления эпидемически значимых штаммов и расщифровки очагов дифтерийной инфекции.

Журн. микробиол., 2016, № 5, С. 50—60

Ключевые слова: *Corynebacterium diphtheriae*, мультилокусное секвенирование ДНК

И.А. Чагина<sup>1</sup>, О.Ю. Борисова<sup>1,2</sup>, Л.И. Кафарская<sup>2</sup>, С.С. Афанасьев<sup>1</sup>,  
В.А. Алешкин<sup>1</sup>, Ю.В. Несвижский, М.С. Афанасьев<sup>3</sup>, А.В. Алешкин<sup>1</sup>,  
Е.В. Юсуф<sup>4</sup>, Т.И. Москвина<sup>5</sup>, Л.И. Пономарева<sup>6</sup>, А.В. Караулов<sup>3</sup>

## COMPOSITION OF POPULATION OF DIPHTHERIA CAUSATIVE AGENT STRAINS IN RUSSIA

<sup>1</sup>Gabricevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, <sup>2</sup>Pirogov Russian National Research Medical University, <sup>3</sup>Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow; <sup>4</sup>Centre for Hygiene and Epidemiology in Khanty-Mansi Autonomous District Yugra, Khanty-Mansiysk; <sup>5</sup>Centre for Hygiene and Epidemiology in Chelyabinsk Region, Chelyabinsk; <sup>6</sup>Centre for Hygiene and Epidemiology in the Udmurt Republic, Izhevsk, Russia

**Aim.** Characteristics of clonal composition of *Corynebacterium diphtheriae* strain population in Russia using MLST, as well as evaluation of a possibility of using of this method during execution of monitoring of diphtheria infection causative agent strains. **Materials and methods.** *C. diphtheriae* strains, isolated in Russia in 1957 — 2015 and sent to Gabricevsky MRIEM reference centre for diphtheria and pertussis, were studied. Genotyping of *C. diphtheriae* using MLST was carried out based on sequencing of «housekeeping» gene fragments. ST identification was carried

out according to PubMLST. *Results.* *C. diphtheriae* strains of 36 sequence-types (ST) were identified on the territory of Russia — 27 previously known and 9 novel, detected for the first time. 2 sequence types ST25 and ST8 (22% and 18%) dominated. Inter-relation between phenotype properties (toxigenicity and biovar) and membership of *C. diphtheriae* strains in certain sequence-types was shown — toxigenic and non-toxigenic *C. diphtheriae* strains of various biovars were characterized by certain sequence-types. Changes of clonal composition of *C. diphtheriae* population in dynamics of epidemic process of diphtheria infection were shown. *Conclusion.* Use of MLST allowed to characterized clonal composition of *C. diphtheriae* strains' population in Russia and has shown perspectives of use of this method to characterize population of diphtheria causative agent, detect epidemically significant strains and decipher foci of diphtheria infection.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 5, P. 50—60

Key words: *Corynebacterium diphtheriae*, multilocus DNA sequencing

## ВВЕДЕНИЕ

Идентификация, классификация и типирование возбудителей инфекционных заболеваний относятся к числу глобальных задач не только прикладной, но и фундаментальной микробиологии и эпидемиологии [13]. Типирование штаммов возбудителей инфекционных заболеваний ставит перед собой несколько задач: выяснить, являются ли выделенные в одном очаге штаммы близкородственными или они не взаимосвязаны между собой; циркулируют ли штаммы на других близлежащих территориях, на других отдаленных территориях и в других странах; появились штаммы недавно или выделялись они в разные временные периоды. Решение таких задач с помощью типирования позволяет изучить и выявить закономерности циркуляции, формирования и эволюционного развития популяций возбудителей инфекционных заболеваний, создание клонов возбудителей и появление эпидемически значимых штаммов.

Изучению штаммов возбудителя дифтерийной инфекции — *Corynebacterium diphtheriae* — посвящено значительное число работ ученых разных стран мира. Биологические свойства оценивались с помощью классических микробиологических (серотипирование, биотипирование, фаготипирование, антибиотикочувствительность), а также молекулярно-генетических методов, таких как гибридизация ДНК, рестрикционный анализ, ПЦР с универсальными праймерами (УП-ПЦР, RAPD), AFLP, пульс-гель электрофорез (PFGE) (ПЦР-ПДРФ (RFLP), риботипирование, мультилокусный энзимэлектрофорез (МЭЭ), сполитотипирование, а также секвенирование отдельных генов [1 — 17].

В настоящее время, благодаря появлению высокотехнологичных молекулярно-генетических технологий и высокопроизводительного секвенирования стало возможным с новых позиций подойти к изучению биологических свойств и внутривидового разнообразия возбудителей инфекционных заболеваний. Одним из таких методов является мультилокусное секвенирование ДНК (Multilocus sequence typing, MLST, МЛСТ), предложенное Maiden M.C. (1998). МЛСТ в последнее десятилетие стало одним из наиболее распространенных методов генотипирования возбудителей инфекционных заболеваний, которое дает возможность охарактеризовывать штаммы микроорганизмов с использованием ДНК-секвенирования внутренних фрагментов генов. К настоящему времени МЛСТ широко используется для мониторинга *Neisseria meningitidis*, *Vibrio vulnificus*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Bordetella pertussis* и др. Схема проведения МЛСТ для *C. diphtheriae* была разработана

Bolt F. et al. [5] и включала штаммы 79 сиквенс-типов, объединенных в 11 клональных комплексов. К настоящему времени в международной базе данных PubMLST (<http://pubmlst.org/>) представлено более 300 сиквенс-типов, выделенных в различных странах мира при оценке состава циркулирующих популяций возбудителя дифтерийной инфекции.

В связи с этим, целью исследования является характеристика клонального состава популяции штаммов *C.diphtheriae*, выделенных в России, с помощью МЛСТ, а также оценка возможности использования этого метода при проведении мониторинга штаммов возбудителя дифтерийной инфекции.

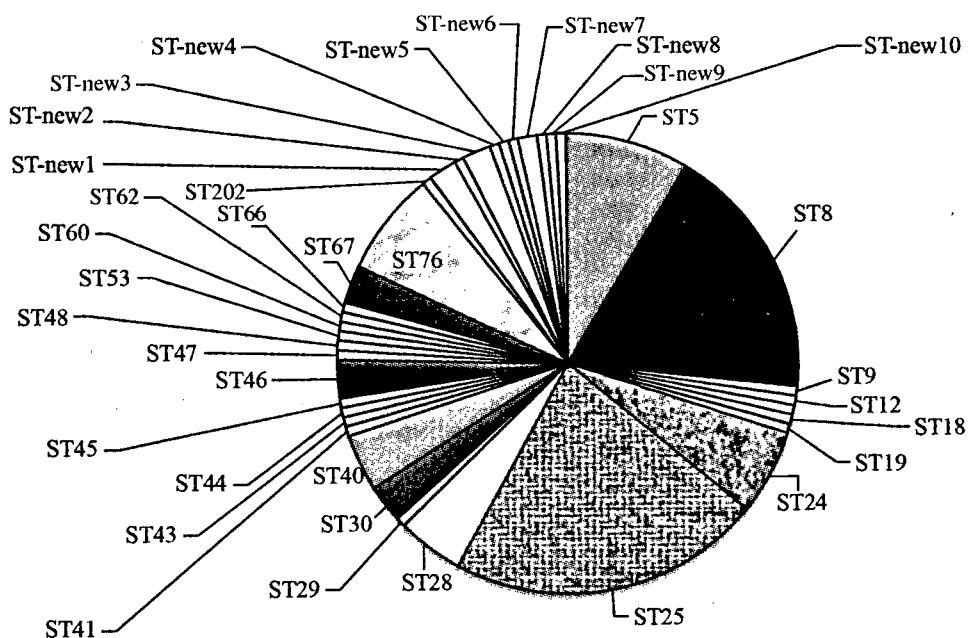
## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе изучено 148 штаммов *C.diphtheriae*, выделенных на территории России с 1957 по 2015 гг. и присланных в референс-центр по дифтерии и коклюшу МНИИЭМ им. Г.Н.Габрического, и два контрольных штамма *C.diphtheriae* № 665 и *C.diphtheriae* PW8. Токсигенных штаммов *C.diphtheriae* было 121, нетоксигенных штаммов — 20 и нетоксигенных токс-несущих штаммов (НТТН-штаммы) — 7. Изученные штаммы *C.diphtheriae* принадлежали к биоварам *gravis* и *mitis*. Выделение штаммов *C.diphtheriae* проводили согласно Методическим указаниям «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции» МУ 4.2.698-98 и МУК 4.2.3065-13. Исследуемый материал засеивали на кровяно-теллуритовую среду (КТА) на основе 2% СПА («Микроген», Махачкала) с 10% ККРС (НПО «Лейтран», Москва) и 0,02 % теллурита калия (ГНЦ ПМБ, Оболенск) и термостатировали 24 — 48 часов при 37<sup>0</sup>С. Выросшие колонии оценивали по культурально-морфологическим, токсигенным и биохимическим свойствам согласно МУ 4.2.698-98 и МУК 4.2.3065-13, а также с использованием тест-системы «ДС-ДИФ-КОРИНЕ» (НПО «Диагностические системы», Н. Новгород).

Хромосомную ДНК выделяли стандартным методом кипячения согласно Маниатис Т., (1984) из 24-часовой культуры *C.diphtheriae*. Генотипирование штаммов *C. diphtheriae* с помощью МЛСТ проводили согласно международному протоколу [5] с последующей модификацией на основе секвенирования фрагментов 7 генов, являющихся генами «домашнего хозяйства» (*house-keeping genes*) — *atpA* (ATP- synthase alpha chain), *dnaE* (DNA polymerase III alpha subunit), *dnaK* (chaperone protein), *fusA* (elongation factor G), *leuA* (2-isopropylmalate synthase), *odhA* (2-oxoglutarate dehydrogenase E1 and E2 components) и *groB* (DNA-direct RNA polymerase beta chain), с последующей идентификацией аллельного профиля каждого штамма. Секвенирование фрагментов генов *groB*, *atpA*, *dnaE*, *dnaK*, *fusA*, *leuA*, *odhA* у штаммов *C.diphtheriae* проводили согласно общепринятому методу (Sanger F., 1977) в ФНКЦ ФХМ ФМБА России (Москва) и ЗАО «Евроген» (Москва). Идентификацию аллелей осуществляли согласно международной базе данных MLST — PubMLST (<http://pubmlst.org/>). Для кластерного анализа использовали программу построения дерева минимальных расстояний (*minimum spanning tree*) на основе аллельных профилей с помощью MEGA 6.06 (<http://www.megasoftware.net/megamac.php>).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Среди изученных штаммов *C. diphtheriae* при секвенировании выявлено от 4 до 12 аллелей этих генов. Все изученные штаммы *C. diphtheriae* были разделены на 36 сиквенс-типов (ST) (рис. 1) — 27 ранее известных и опубликованных в базе данных — ST5, ST8, ST12, ST17, ST18, ST19, ST24, ST25, ST28, ST29, ST30, ST32, ST40, ST41, ST43, ST44, ST45, ST46, ST47, ST48, ST53, ST60, ST62, ST66, ST67, ST76, ST202 и девять новых, выявленных нами впервые — ST-new1, ST-new2, ST-new3, ST-new4, ST-new5, ST-new6, ST-new7, ST-new8, ST-new9. Из них,



**Рис. 1.** Удельный вес штаммов *C.diphtheriae* различных сиквенс-типов, выделенных в России в 1957 – 2015 гг.

согласно PubMLST, каждый аллельный профиль соответствовал определенному сиквенс-типу: ST5 – 2-4-4-1-3-3-5 профиль, ST8 – 3-5-6-5-3-3-6, ST12 – 1-5-6-5-3-3-6, ST17 – 5-8-12-10-10-6-4, ST18 – 8-6-7-6-6-3-8, ST19 – 2-6-7-6-6-3-8, ST24 – 2-4-15-6-7-8-9, ST25 – 5-6-7-6-6-3-8, ST28 – 2-9-3-13-3-3-3, ST29 – 10-8-16-14-10-3-5, ST30 – 10-8-16-14-10-3-9, ST32 – 3-1-18-4-13-3-5, ST40 – 8-3-19-2-7-3-3, ST41 – 2-9-22-13-3-3-3, ST43 – 15-1-18-4-13-3-5, ST44 – 14-2-23-4-2-14-2, ST45 – 2-1-2-1-3-1-2, ST46 – 16-4-8-1-7-16-9, ST47 – 2-11-9-19-17-17-9, ST48 – 4-4-25-6-3-5-9, ST53 – 2-1-2-1-3-3-2, ST60 – 2-5-3-1-3-3-9, ST62 – 4-1-18-4-3-16-2, ST66 – 3-5-6-5-11-3-6, ST67 – 3-2-3-6-3-3-2, ST76 – 2-9-1-1-13-3-2, ST202 – 2-4-58-1-3-3-5 профиль. Девять новых сиквенс-типов имели следующий аллельный профиль: ST-new1 – 18-10-27-19-4-3-16 профиль, ST-new2 – 4-1-4-4-3-16-2, ST-new3 – 19-12-4-1-3-3-2, ST-new4 – 19-5-16-5-3-3-6, ST-new5 – 3-8-6-1-10-3-2, ST-new6 – 2-1-20-4-4-3-6, ST-new7 – 16-4-5-1-3-30-9, ST-new8 – 18-10-27-19-20-3-16, ST-new9 – 19-8-16-1-10-3-2 прфиль, нуклеотидные последовательности которых в настоящее время отправлены в международную базу данных.

Среди изученных штаммов *C.diphtheriae* доминирующими были два сиквенс-типа ST25 и ST8, к которым относились 22 и 18% изученных штаммов (рис. 1); 9% штаммов *C.diphtheriae* принадлежали к ST5, 7% – к ST76, 6% – к ST24, 5% – к ST28, 4% – к ST40. С меньшей частотой встречаемости (по 3% штаммов *C.diphtheriae*) были зарегистрированы ST30, ST46, ST67; по 2% штаммов *C.diphtheriae* относились к ST-new1 и ST-new3. Остальные сиквенс типы среди изученных штаммов *C.diphtheriae* встречались в единичном проценте случаев. Производственный вакцинный штамм *C.diphtheriae* PW8 характеризовался ST44, штаммов с таким сиквенс-типом среди изученных нами штаммов *C.diphtheriae* обнаружено не было. Контрольный токсигенный штамм *C.diphtheriae* биовара *gravis* № 665, выделенный еще в 1960-е годы, относился к ST25.

Далее нами были проанализированы данные о возможной связи способности штаммов *C.diphtheriae* к продукции дифтерийного токсина и принадлежности их к различным сиквенс-типам. Оказалось, что токсигенные штаммы *C.diphtheriae* принадлежали к 26 сиквенс-типам, а нетоксигенные штаммы

*C.diphtheriae* относились к 9 сиквенс-типам. Анализ принадлежности штаммов *C.diphtheriae* разных биоваров к сиквенс-типам показал, что для штаммов различных биоваров характерны определенные сиквенс-типы. Так, штаммы *C.diphtheriae* биовара *gravis* принадлежали к 15 сиквенс-типам, а штаммы биовара *mitis* — к 20 сиквенс-типам.

Для большинства токсигенных штаммов *C.diphtheriae* биовара *gravis* были характерны два сиквенс-типа — ST25 (к нему относилось 33 штамма) и ST8 — 27 штаммов; 3 токсигенных штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* относились к ST-new1, к остальным 11 сиквенс-типам принадлежали единичные штаммы (рис. 2). Среди токсигенных штаммов *C.diphtheriae* биовара *mitis* преобладали четыре сиквенс-типа: большинство штаммов (13 штаммов) относились к ST5, 9 штаммов — к ST24, 7 штаммов — к ST28, 4 штамма — к ST46, 3 — к ST-new3, 2 — к ST-new7, остальные сиквенс-типы встречались в единичных случаях (рис. 3). Нетоксигенные штаммы *C.diphtheriae* биовара *mitis* разделились следующим образом: большинство штаммов (8 штаммов) относились к ST76, 4 штамма — к ST30, 2 — к ST40, все остальные сиквенс-типы встречались в единичных случаях.

Для оценки филогенетических взаимоотношений между изученными штаммами *C.diphtheriae* и уточнения времени их дивергенции использованы методы определения эволюционных дистанций, основанные на сравнении нуклеотидных последовательностей гомологичных генов. Анализ полученных данных и визуализация филогенетических отношений осуществлялись путем построения дендрограммы (рис. 4). Данный анализ позволяет нам оценить родство сиквенс-типов, а также увидеть, какие сиквенс-типы имеют более раннее в эволюционном плане происхождение.

Анализ показал, что популяция штаммов *C.diphtheriae* обладает высокой степенью гетерогенности. Все изученные штаммы разделились на два кластера. Первый кластер представлен двумя субкластерами, первый из которых включает две ветви. В одну ветвь вошли токсигенные штаммы *C.diphtheriae* сиквенс-типа ST5, выделенные в период 1950 — 1969 гг., и близкие к ним ветви, включающие штаммы *C.diphtheriae*, выделенные в последующие годы, все принадлежащие к биовару *mitis*. Основу второй ветви составили токсигенные

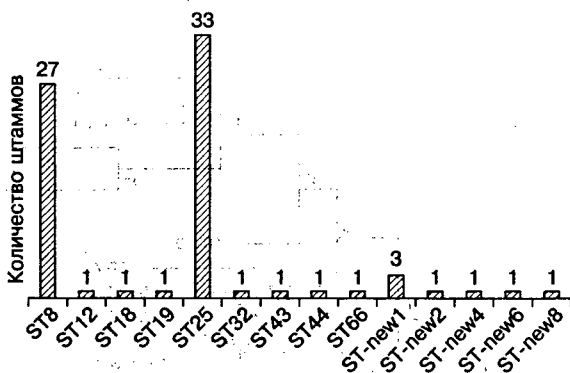


Рис. 2. Частота встречаемости токсигенных штаммов *C.diphtheriae* биовара *gravis* различных сиквенс-типов.

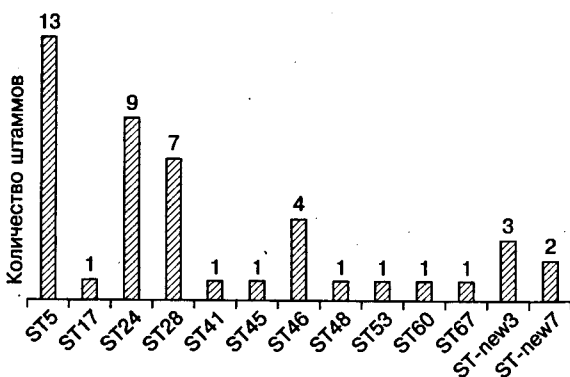


Рис. 3. Частота встречаемости токсигенных штаммов *C.diphtheriae* биовара *mitis* различных сиквенс-типов.

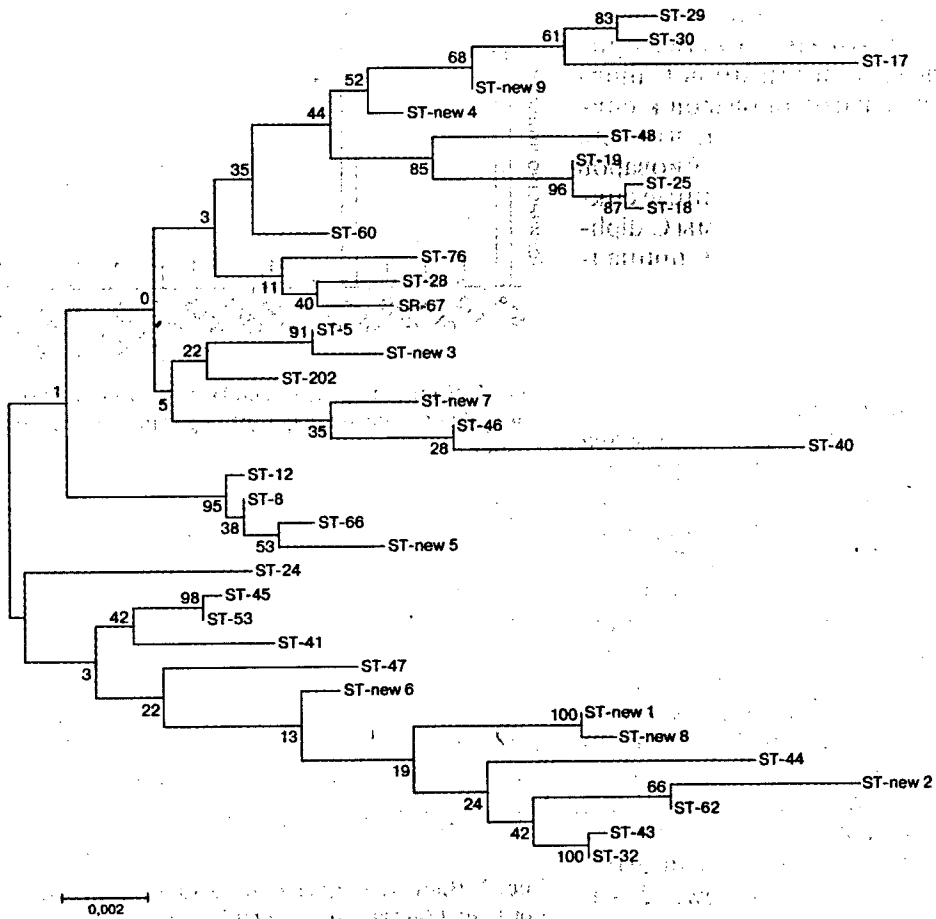


Рис. 4. Дендрограмма филогенетических взаимоотношений штаммов *C. diphtheriae*, построенная с помощью MEGA 6.06.

штаммы *C. diphtheriae* сиквенс-типа ST25, также выделенные в период 1950 — 1969 гг., и близкие к ним ветви, включающие штаммы *C. diphtheriae*, выделенные в последующие годы, преимущественно биовара *gravis*. Во второй кластер вошли токсигенные штаммы *C. diphtheriae* сиквенс-типа ST24 биовара *mitis*, выделенные, начиная с 1970-х гг. и давшие основу для токсигенных штаммов *C. diphtheriae* двух биоваров, выделенных в 1980-е, 1990-е и 2000-е годы. Вместе с тем, у данного дерева есть недостаток, заключающийся в том, что при проверке достоверности данных с помощью метода «rapid bootstrap» оказалось, что достоверность для оценки эволюционных взаимоотношений падает от «предка к потомку». Скорее всего, это связано с высокой генетической вариабильностью штаммов *C. diphtheriae*. В связи с этим, трудно сделать выводы об эволюционных взаимоотношениях между штаммами. Вместе с тем, при анализе ветвей можно отметить, что есть ветви, включающие современные токсигенные штаммы *C. diphtheriae* (ST28 и ST67, ST-new1, ST-new6 и ST-new8), а есть ветви, состоящие из токсигенных штаммов *C. diphtheriae* более раннего происхождения (ST-new7 и ST46, ST-new3 и ST5). Однако видно, что почти во всех случаях близкородственные штаммы *C. diphtheriae* начинали выделяться приблизительно одновременно.



Учитывая небольшое количество изученных штаммов *C.diphtheriae*, мы предприняли попытку проанализировать распространение штаммов *C.diphtheriae* различных сиквенс-типов в различные периоды эпидемического процесса дифтерийной инфекции. С этой целью все изученные штаммы *C.diphtheriae* были разделены на шесть групп. В первую группу вошли штаммы *C.diphtheriae*, выделенные в допрививочный период и первые десять лет проведения массовой иммунизации (1957 — 1969 гг.), во вторую группу — штаммы *C.diphtheriae*, выделенные в 1970 — 1979 гг., в третью группу — штаммы *C.diphtheriae*, выделенные в 1980 — 1989 гг., в четвертую группу — штаммы *C.diphtheriae*, выделенные в период подъема и начала снижения заболеваемости дифтерией (1990 — 1999 гг.). Пятая группа состояла из штаммов *C.diphtheriae*, выделенных в 2000 — 2009 гг., и в шестую группу вошли штаммы *C.diphtheriae*, выделенные в последние шесть лет (2010 — 2015 гг.).

Среди штаммов *C.diphtheriae*, выделенных в 1957 — 1969 гг., были зарегистрированы штаммы четырех сиквенс-типов — ST25, ST5, ST19 и ST62. Из них большинство штаммов (83,0%) принадлежало к биовару *gravis* и сиквенс-типу ST25, который характерен для контрольного токсигенного штамма *C.diphtheriae* № 665, выделенного в 1960-е годы. Изученные токсигенные штаммы *C.diphtheriae* принадлежали к трем сиквенс-типам, из которых штаммы биовара *gravis* относились к двум сиквенс-типам — ST19 и ST25, а штаммы биовара *mitis* — к одному сиквенс-типу ST5.

Среди штаммов *C.diphtheriae*, выделенных в 1970 — 1979 гг., были зарегистрированы штаммы шести сиквенс-типов — ST25, ST5, ST24, ST-new2, ST32 и ST202. Токсигенные штаммы *C.diphtheriae* принадлежали к пяти сиквенс-типам — ST25, ST-new2, ST32, ST5 и ST24. Среди них токсигенные штаммы *C.diphtheriae* биовара *gravis* были представлены тремя сиквенс-типами — ST25, ST-new2 и ST32. У токсигенных штаммов *C.diphtheriae* биовара *mitis* зарегистрированы два сиквенс-типа — ST5 и ST24.

Среди штаммов *C.diphtheriae*, выделенных в 1980 — 1989 гг., было отмечено большее разнообразие циркулирующих сиквенс-типов и зарегистрированы штаммы тринадцати сиквенс-типов — ST5, ST8, ST24, ST25, ST43, ST46, ST47, ST48, ST53, ST60, ST66, ST-new3 и ST-new7. Токсигенные штаммы *C.diphtheriae* принадлежали к двенадцати сиквенс-типам — ST24, ST46, ST5, ST-new3, ST-new7, ST48, ST53 и ST60, ST8, ST25, ST43 и ST 66. Среди токсигенных штаммов *C.diphtheriae* преобладали штаммы биовара *mitis*, у которых выявлено большое разнообразие циркулирующих сиквенс-типов. Зарегистрировано девять сиквенс-типов — ST24, ST46, ST5, ST-new3, ST-new7, ST48, ST53 и ST60 с преобладанием штаммов двух сиквенс-типов — ST24 и ST46. У токсигенных штаммов *C.diphtheriae* биовара *gravis* выделено четыре сиквенс-типа — ST8, ST25, ST43 и ST 66, из которых преобладали штаммы сиквенс-типа ST8.

Среди штаммов *C.diphtheriae*, выделенных в период эпидемического подъема заболеваемости дифтерией и начала ее снижения — 1990 — 1999 гг., были зарегистрированы штаммы одиннадцати сиквенс-типов — ST5, ST8, ST12, ST17, ST18, ST24, ST29, ST30, ST40, ST45 и ST-new4. Токсигенные штаммы *C.diphtheriae* относились к восьми сиквенс-типам — ST8, ST12, ST18, ST-new4, ST5, ST24, ST17 и ST45. Токсигенные штаммы *C.diphtheriae* биовара *gravis* принадлежали к 4 сиквенс-типам — ST8, ST12, ST18 и ST-new4. Токсигенные штаммы *C.diphtheriae* биовара *mitis* также относились к четырем сиквенс-типам — ST5, ST24, ST17 и ST45.

Среди штаммов *C.diphtheriae*, выделенных в период снижения заболеваемости дифтерией (2000 — 2009 гг.), зарегистрированы штаммы девяти сиквенс-

типов — ST5, ST8, ST25, ST28, ST41, ST-new1, ST-new5, ST-new6 и ST-new8, из которых токсигенные штаммы *C.diphtheriae* принадлежали к восьми сиквенс-типам — ST8, ST-new1, ST25, ST-new6, ST-new8, ST28, ST5 и ST41. Из них токсигенные штаммы *C.diphtheriae* биовара *gravis* принадлежали к пяти сиквенс-типам — ST8, ST-new1, ST25, ST-new6 и ST-new8, а токсигенные штаммы биовара *mitis* — к трем сиквенс-типам — ST28, ST5 и ST41.

В последние шесть лет на территории России зарегистрированы штаммы 8 сиквенс-типов — T5, ST8, ST25, ST28, ST40, ST67, ST76 и ST-new9, из которых токсигенные штаммы относились к четырем сиквенс-типам — ST8, ST25, ST5 и ST67. Токсигенные штаммы *C.diphtheriae* биовара *gravis* представлены двумя сиквенс-типами — ST8 и ST25, токсигенные штаммы *C.diphtheriae* биовара *mitis* также относились к двум сиквенс-типам — ST5 и ST67. Среди выделенных токсигенных штаммов *C.diphtheriae* практически с одинаковой частотой превалировали штаммы биовара *gravis* сиквенс-типа ST8 и биовара *mitis* сиквенс-типа ST67.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Учеными МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского разработана система эпидемиологического надзора за дифтерийной инфекцией, которая опирается на глубокое понимание эпидемиологических закономерностей, особенности клинического течения и предусматривает наблюдение за фенотипическими и генотипическими свойствами штаммов *C.diphtheriae* [1, 2, 3, 9]. И.К. Мазуровой в 1990-е годы разработана комплексная система наблюдения за возбудителем дифтерийной инфекции, основу которой составили классические микробиологические, иммунохимические (реакция непрямой гемагглютинации, иммуноферментный анализ) и молекулярно-генетические методики (ДНК-ДНК гибридизация нуклеиновых кислот, полимеразная цепная реакция по выявлению гена дифтерийного токсина). Применение такого комплексного подхода позволило установить, что возбудитель дифтерии, его биологические свойства могут влиять на развитие эпидемического и тяжесть инфекционного процесса. С.Ю. Комбарова в дальнейшем расширила систему мониторинга возбудителя дифтерийной инфекции с использованием высокоинформативных молекулярно-генетических технологий — риботипирование, мультилокусный энзимный электрофорез (МЭЭ), полимеразная цепная реакция с универсальными праймерами (УП-ПЦР) и секвенирование отдельных генов. Многолетний микробиологический и молекулярно-генетический мониторинг штаммов *C.diphtheriae*, проводимый в МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского, позволил установить особенности биологических свойств штаммов и формирования структуры популяции *C.diphtheriae* в различные периоды эпидемического процесса дифтерийной инфекции [1, 2, 3, 9].

Проведенное исследование показало, что для токсигенных штаммов *C.diphtheriae* характерно более выраженное разнообразие сиквенс-типов (26 сиквенс-типов), чем для нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* (9 сиквенс-типов). Кроме того, для штаммов *C.diphtheriae* различных биоваров характерны определенные сиквенс-типы и отмечается более выраженная гетерогенность для штаммов биовара *mitis* (20 сиквенс-типов), чем для штаммов биовара *gravis* (15 сиквенс-типов). Анализ данных о принадлежности токсигенных и нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* двух биоваров к сиквенс-типам показал прямую взаимосвязь между фенотипическими свойствами (токсигенность и биовар) и принадлежностью штаммов *C.diphtheriae* к определенному сиквенс-типу. Так, токсигенные штаммы *C.diphtheriae* биовара *gravis* принад-

лежали к 14 сиквенс-типам: ST8, ST12, ST18, ST19, ST25, ST32, ST43, ST44, ST66, ST-new1, ST-new2, ST-new4, ST-new6, ST-new8. Токсигенные штаммы *C.diphtheriae* биовара *mitis* принадлежали к 13 сиквенс-типам: ST5, ST17, ST24, ST28, ST41, ST45, ST46, ST48, ST53, ST60, ST-new3, ST-new7. Нетоксигенные штаммы *C.diphtheriae* биовара *gravis* относились к ST62. Нетоксигенные штаммы *C.diphtheriae* биовара *mitis* принадлежали к 8 сиквенс-типам: ST29, ST30, ST40, ST47, ST76, ST202, ST-new5, ST-new9.

Анализ распространения штаммов *C.diphtheriae* различных сиквенс-типов в динамике эпидемического процесса дифтерийной инфекции показал, что среди штаммов *C.diphtheriae*, выделенных в 1957 — 1969 гг., большинство (83,0%) штаммов принадлежало к биовару *gravis* ST25, который характерен и для контрольного токсигенного штамма *C.diphtheriae* № 665, выделенного в 1960-е годы. Среди штаммов *C.diphtheriae*, циркулирующих в 1970 — 1979 гг., также преобладали штаммы *C.diphtheriae* биовара *gravis* ST25, но удельный вес их снизился, а к концу 1970-х годов увеличился удельный вес штаммов биовара *mitis* ST5. В 1980-е годы у штаммов *C.diphtheriae* отмечено увеличение разнообразия циркулирующих сиквенс-типов, где среди токсигенных штаммов преобладали штаммы биовара *mitis* двух сиквенс-типов — ST24 и ST46, а у штаммов биовара *gravis* — ST8, последний из которых превалировал в период эпидемического подъема заболеваемости дифтерией 1990-х годов и ее снижения (2000 — 2009 гг.). В последние шесть лет на территории России зарегистрированы штаммы 8 сиквенс-типов, из которых токсигенные штаммы относились к четырем сиквенс-типам и с практически одинаковой частотой превалировали штаммы биовара *gravis* ST8 и биовара *mitis* ST67. Причем первый токсигенный штамм *C.diphtheriae* сиквенс-типа ST67 был выделен в Ханты-Мансийском АО в 2012 г., и уже в 2015 г. на этой же территории были идентифицированы три токсигенных штамма этого сиквенс-типа от лиц, не имевших между собой контактов.

Следует отметить, что токсигенные штаммы *C.diphtheriae* сиквенс-типов ST5 и ST25 регистрировали на территории России, начиная с 1960-х годов и по настоящее время, что может свидетельствовать о том, что такие сиквенс-типы циркулируют постоянно на территории России с определенной частотой, варьируя в различные периоды. В то время, как ST8 был зарегистрирован на территории России только в 1980-е годы, что может свидетельствовать о ввозе данных штаммов на территорию России. Штаммы с этим сиквенс-типом заняли доминирующее положение в популяции в период эпидемического подъема заболеваемости дифтерией 1990-х годов и до сих пор выделяются на территории нашей страны. По данным зарубежных исследователей [4, 13], два клональных комплекса, включающих четыре сиквенс-типа — ST8, ST12, ST52 и ST66, связывают с подъемом заболеваемости дифтерией в 1990-х годах, т.е. они имеют, как полагают, наибольшую эпидемиологическую значимость. Однако токсигенные штаммы *C.diphtheriae* ST66 были зарегистрированы только в незначительном проценте случаев в 1980-е годы, а штаммов ST52 вообще не выделяли в России.

Метод МЛСТ используется для характеристики токсигенных и нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* в Англии, Германии, Польше, Франции и Бразилии [5, 6, 10, 14 — 16]. Так, при идентификации генотипа токсигенных штаммов *C.diphtheriae*, выделенных в Англии в 2007 — 2013 гг., было обнаружено 8 сиквенс-типов — ST10, ST261, ST262, ST263, ST264, ST265, ST266 и ST267 [6, 15, 16]. Выделенный в Германии в июне 2015 г. от больного дифтерией токсигенный штамм *C.diphtheriae* принадлежал к другому сиквенс-типу

— ST255 [4]. Однако такие сиквенс-типы на территории России не выделяли. Аналогичные исследования *C.diphtheriae* с помощью метода МЛСТ, проведенные в Польше, Франции и Бразилии, были посвящены характеристике нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* [7, 10, 14 — 16]. Идентифицировано от 6 до 11 сиквенс-типов, из них большинство штаммов объединены в три сиквенс-типа — ST8, ST-82 и ST130. Однако нетоксигенных штаммов данных сиквенс-типов также на территории России пока не выделено. Обобщая литературные данные по мультилокусному секвенированию штаммов *C.diphtheriae*, можно сказать, что в настоящее время происходит накопление данных о выделенных сиквенс-типах, которые аккумулируются в международной базе данных PubMLST, где представлено более 300 сиквенс-типов. Вместе с тем, данный метод может быть использован с высокой степенью достоверности для характеристики циркулирующих штаммов возбудителя дифтерии при расследовании вспышек и расшифровке завозных случаев.

Таким образом, впервые в России оценен клональный состав циркулирующей популяции возбудителя дифтерии с помощью МЛСТ. Идентифицированы штаммы *C.diphtheriae* 36 сиквенс-типов, 27 из которых описаны в международной базе PubMLST, и девять новых сиквенс-типов, идентифицированных нами впервые. Среди штаммов *C.diphtheriae* доминировали штаммы ST25 и ST8. Показаны взаимосвязи между фенотипическими свойствами (токсигенность и биовар) и принадлежностью штаммов *C.diphtheriae* к определенному сиквенс-типу — токсигенные и нетоксигенные штаммы *C.diphtheriae* различных биоваров характеризовались определенными сиквенс-типами. Использование МЛСТ позволило охарактеризовать циркулирующую популяцию штаммов *C.diphtheriae*, выделенных в России, и показало перспективность применения этого метода для характеристики популяции возбудителя дифтерии, выявления эпидемически значимых штаммов (клональных комплексов) и расшифровки очагов дифтерийной инфекции.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Комбарова С. Ю., Борисова О. Ю., Мельников В. Г. и др. Полиморфизм генов *tox* и *dtxR* у циркулирующих штаммов *Corynebacterium diphtheriae*. Журн. микробиол. 2009, 1: 7-11.
2. Мазурова И.К., Комбарова С.Ю., Борисова О.Ю. и др. Мониторинг возбудителя дифтерийной инфекции. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2009, 3 (46): 17-22.
3. Мазурова И.К., Борисова О.Ю., Комбарова С.Ю. и др. Характеристика штаммов *C.diphtheriae*, циркулирующих в России в различные периоды эпидемического процесса дифтерийной инфекции. Инфекция и иммунитет. 2012, 2(1 — 2): 294.
4. Berger A., Meinel D.M., Schaffer A. et al. A case of pharyngeal diphtheria in Germany, June 2015. *Infection*. DOI 10.1007/s15010-016-0882-2.
5. Bolt F., Cassidy P., Tondella M. et al. Multilocus sequence typing identifies evidence for recombination and two distinct lineages of *C.diphtheriae*. *J. Clin. Microbiol.* 2010, 48 (11): 4177-4185.
6. Both L., Collins S., Zoysa A. et al. Molecular and epidemiological review of toxigenic diphtheria infections in England between 2007 and 2013. *JCM.* 2015, 53 (2): 567-572.
7. Fafour E., Badell E., Zasada A. et al. Characterization and comparison of invasive *C.diphtheriae* isolates from France and Poland. *J. Clin. Microbiol.* 2012, 50 (1): 173-175.
8. Grimont F., Grimont P. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 1986, 137 B (2): 165-175.
9. Комбарова С., Kim C., Melnikov V. et al. Rapid identification of *Corynebacterium diphtheriae* clonal group associated with diphtheria epidemic, Russian Federation. *J. Infect. Dis.* 2001, 7, 1: 133-136.
10. Mattos-Guaraldi A. L., Moreira L. O., Damasco P. V. et al. Diphtheria remains a threat to health in developing world — an overview. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz.* 2003, 98: 987-993.

11. Mokrousov I., Narvskaya O., Limeshenko E. et al. Efficient discrimination within *Corynebacterium diphtheriae* clonal group by a novel macroarray-based method. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43, № 4: 662-668.
12. Popovic T., Kombarova S. J., Reeves M. W. et al. Molecular epidemiology of diphtheria in Russia. *J. Infectious Diseases.* 1997, 174: 1064-1072.
13. Spratt B. G., Maiden M. C. Bacterial population genetics, evolution and epidemiology. *Philosophical Transactions Royal Society B.* 1999, 354: 701-710.
14. Viguetti S., Pacheco L., Santos L. et al. Multilocus sequence types of invasive *C. diphtheriae* isolated in the Rio de Janeiro urban area, Brazil. *J. Epidemiol. Infect.* 2011, 139: 1-4.
15. Wagner K., White J., Lucenko I. et al. Diphtheria in postepidemic period, Europe, 2000 – 2009. *J. Emerg. Infect. Dis.* 2012, 18 (2): 217-225.
16. Zakikhany K., Efstratiou A. Diphtheria in Europe: current problems and new challenges. *Future Microbiol.* 2012, 7 (5): 595-607.
17. Zoysa A., Efstratiou A., Hawkey P. H. et al. Molecular characterization of diphtheria toxin repressor (*dtxR*) genes present in nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains isolated in the United Kingdom. *J. Clinical Microbiology.* 2005, 43, 1: 223-228.

*Поступила 01.06.16*

Контактная информация: Чагина Ирина Алексеевна,  
125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, р.т. (499)747-64-84

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*С.Б.Яцышина, А.Н.Рентеева, А.В.Валдохина, М.А.Елькина,  
А.С.Сперанская, Е.В.Пимкина, Р.Р.Минтаев, М.Л.Маркелов, В.В.Малеев*

## **ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСОВ ГРИППА А/Н3N2 И В, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ В РОССИИ В 2013 — 2015 ГГ.**

Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, Москва

*Цель.* Установить генетическую характеристику, провести филогенетический анализ и определение молекулярных маркеров резистентности к этиотропным препаратам вирусов гриппа А/Н3N2 и В, циркулировавших в России в 2013 — 2015 гг. *Материалы и методы.* Исследованы 80 биологических образцов, содержащих РНК вируса гриппа А/Н3N2, и 31 образец, содержащий РНК вируса гриппа В. Секвенирование фрагментов ПЦР выполнялось на ABI-3100 PRIZM™ GeneticAnalyzer (AppliedBiosystems, США) и с использованием MiSeq (Illumina, США). Обработка и анализ данных проводились с помощью программ CLC v.3.6.5., DNASTAR и BioNumerics v.6.5. *Результаты.* В 2013 — 2014 гг. доминировали вирусы гриппа А/Н3N2 клайда 3С.3, подобные вакцинному штамму А/Texas/50/2012, 10% принадлежали к субклайду 3С.2а и 10% — к 3С.3b. Подавляющее большинство (81%) вирусов 2014 — 2015 гг. вошли в клайд 3С.2а, доля вирусов, относящихся к 3С.3b и 3С.3а, составляла 9% и 10%. Среди исследованных вирусов гриппа В преобладали Ямагата-подобные, лишь 1 вирус в 2014 — 2015 гг. относился к линии Виктория, обнаружен 1 реассортант линий Ямагата и Виктория. Во всех вирусах гриппа А/Н3N2 выявлена мутация устойчивости к ремантадину S31N (белок М2). Мутации, определяющие устойчивость к озельтамивиру (ген NA), вирусов гриппа А/Н3N2 и В обнаружены не были. *Заключение.* Подъем заболеваемости гриппом в 2014 — 2015 гг. обусловлен появлением вирусов гриппа А/Н3N2 и В, отличающихся по антигенному составу от циркулировавших ранее и от вошедших в вакцину, что привело к решению ВОЗ заменить компоненты А/Н3N2 и В вакцины 2015 — 2016 гг. Одновременная циркуляция двух линий вируса гриппа В и появление их реассортантов свидетельствует о целесообразности применения четырехвалентной вакцины, включающей обе линии.

Журн. микробиол., 2016, № 5, С. 60—72

Ключевые слова: вирусы гриппа, ПЦР, филогенетический анализ

S.B. Yatsyshina, A.N. Renteeva, A.V. Valdokhina, M.A. Elkina,  
A.S. Speranskaya, E.V. Pimkina, R.R. Mintaev, M.L. Markelov, V.V. Maleev

## GENETIC CHARACTERISTICS OF INFLUENZA A/H3N2 AND B VIRUSES THAT HAD CIRCULATED IN RUSSIA IN 2013 — 2015

Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

**Aim.** Establish genetic characteristics, carry out phylogenetic analysis and determination of molecular markers of resistance to etiotropic preparations against influenza A/H3N2 and B viruses that had circulated in Russia in 2013 — 2015. **Materials and methods.** 80 biological samples containing influenza A/H3N2 virus RNA and 31 samples containing influenza B virus RNA were studied. Sequencing of PCR fragments was carried out in ABI-3100 PRIZMTM GeneticAnalyzer (Applied Biosystems, USA) and using MiSeq (Illumina, USA). Data treatment and analysis was carried out using CLC v.3.6.5., DNASTAR and BioNumerics v.6.5. programs. **Results.** In 2013 — 2014 A/Texas/50/2012-like clade 3C.3 influenza A/H3N2 viruses dominated, 10% belonged to subclade 3C.2a and 10% — to 3C.3b. Most of the viruses (81%) of 2014 — 2015 were of 3C.2a clade, the portion of viruses belonging to 3C.3b and 3C.3a was 9 and 10%. Yamagata-like viruses predominated among the studied influenza B viruses, only 1 virus of 2014 — 2015 belonged to Victoria lineage, 1 reassortant of Yamagata and Victoria lineages was detected. Rimantadine-resistance mutation S31N (M2 protein) was detected in all the influenza A/H3N2 viruses. Mutations determining resistance to oseltamivir (NA gene) were not detected in influenza A/H3N2 and B viruses. **Conclusion.** Increase of influenza morbidity in 2014 — 2015 was determined by the emergence of influenza A/H3N2 and B viruses, antigenically distinct from those that had circulated previously and those included into the vaccine, thus resulting in the WHO decision to change A/H3N2 and B components of the 2015 — 2016 vaccine. Simultaneous circulation of 2 lineages of influenza B virus and emergence of their reassortants gives evidence on the necessity of use of quadrivalent vaccines, containing both lineages.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 5, P. 60—72

Key words: influenza viruses, PCR, phylogenetic analysis

## ВВЕДЕНИЕ

Сезонные эпидемии гриппа ежегодно охватывают значительную часть населения как России, так и всего мира. Этиологическая структура гриппа варьирует от сезона к сезону, в эпидемическом процессе участвуют вирусы гриппа А (субтипы H3N2 и H1N1) и вирусы гриппа В.

Вирус гриппа А/H3N2 циркулирует в популяции людей с 1968 г. (пандемия, названная «гонконгским гриппом») [10]. Периодически он вызывает значительные эпидемии, как, например, в сезоне 2003 — 2004 гг. [18].

В настоящее время циркулируют две антигенные линии вируса гриппа В, обозначаемые В/Victoria/2/1987-like (Викторианская линия) и В/Yamagata/16/1988-like (линия Ямагата) [17]. По-видимому, их разделение произошло в 1970-х годах, когда в Китае впервые был обнаружен вирус гриппа В Викторианской линии [8]. До середины 1980-х доминировала линия Ямагата, с 1987 по 1989 преобладала линия Виктория. В 1990-е годы преобладали вирусы линии Ямагата, за исключением эпидемии в Азии в сезоне 1996 — 1997 гг. В период 2001 — 2006 гг. доминировали вирусы линии Виктория. Начиная с сезона 2006 — 2007 гг. в северном полушарии преобладает линия Ямагата [9]. Вирусы гриппа В обычно не доминируют в этиологической структуре сезонного гриппа.

Анализ этиологической структуры гриппа в США с 1976 по 2007 гг. показал, что в этот временной промежуток грипп А доминировал чаще, чем грипп В

[9]. Грипп В превалировал примерно один раз в 3 — 4 сезона. Среди вирусов гриппа А ведущую позицию значительно чаще занимал субтип А/Н3N2, чем субтип А/Н1N1.

С 2009 года циркулируют вирусы гриппа А двух субтипов: А/Н3N2 и А/Н1N1pdm09 и вирусы гриппа В двух линий (Ямагата-подобные и Виктория-подобные) [6]. В сезоне 2009 — 2010 гг., названном пандемическим, во всем мире превалировал вирус субтипа А/Н1N1pdm09 (98,7%), в конце сезона выявлялся вирус гриппа В. В постпандемическом сезоне 2010 — 2011 гг. доля вируса А/Н1N1pdm09 снизилась (56%), но он все еще продолжал преобладать [22]. В сезонах 2011 — 2012, 2012 — 2013 гг. в России отмечалась низкая интенсивность эпидемического подъема заболеваемости гриппом смешанной этиологии.

Впервые после 2009 г. эпидемия гриппа была вызвана вирусом гриппа субтипа А/Н3N2 (65%) в сезоне 2012 — 2013 гг. в США [16]. В России субтип А/Н3N2 стал превалировать в этиологической структуре гриппа (47,2%), начиная с сезона 2013 — 2014 гг., доля вируса гриппа В составляла 7,8% [4]. Эпидемический сезон 2014 — 2015 гг. в России был умеренным. В структуре идентифицированных вирусов гриппа доля вируса гриппа А/Н3N2 составила 69,5%, вируса гриппа В — 25,0%, а вируса гриппа А/Н1N1pdm09 — всего 5,5% [5]. Летальных случаев, зарегистрированных в России, вызванных вирусами гриппа А/Н3N2 и гриппа В, значительно меньше, чем вызванных вирусом гриппа А/Н1N1pdm09.

В данной работе проведен молекулярно-генетический анализ вирусов гриппа А субтипа Н3N2 и гриппа В, циркулировавших в России в эпидемические сезоны 2013 — 2014, 2014 — 2015 гг. и их сравнение с вакцинными штаммами А/Texas/50/2012 (А/Н3N2), В/Massachusetts/02/2012 (линия Ямагата), В/Brisbane/60/2008 (линия Виктория гриппа В) и между собой. Проведен филогенетический анализ генов гемагглютинина и нейраминидазы, анализ генома вирусов гриппа на наличие молекулярных маркеров резистентности к противовирусным препаратам.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обнаружение РНК вирусов гриппа А/Н3N2 и В в клиническом и посмертном материале производилось в лабораториях Центров гигиены и эпидемиологии 17 субъектов РФ методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией с использованием наборов реагентов «АмплиСенс Influenza virus А/В», «АмплиСенс Influenza virus А-тип-FL» (ЦНИИЭ). В Референс-центре по мониторингу за инфекциями верхних и нижних дыхательных путей на базе ЦНИИЭ в Москве образцы материала исследовались повторно для подтверждения типа (субтипа) вирусов гриппа А/Н3N2 и В и выполнялся молекулярно-генетический анализ.

В сезоне 2013 — 2014 гг. были исследованы 10 клинических образцов (от выздоровевших пациентов), содержащих РНК вируса гриппа А/Н3N2, и 2 клинических образца, содержащих РНК вируса гриппа В (от летальных случаев). В сезоне 2014 — 2015 гг. — 70 образцов гриппа А/Н3N2 (среди них 11 от летальных случаев) и 29 образцов гриппа В (среди них 10 от летальных случаев).

Экстракцию нуклеиновых кислот из биологического материала (мазки со слизистой носоглотки и ротоглотки, посмертный материал (образцы легких, трахеи, бронхов, печени и селезенки) с последующей реакцией обратной транскрипции выполняли с использованием наборов «Рибо-преп» и «Реверта-L» («АмплиСенс», ЦНИИЭ). Проводилось секвенирование генов

НА, NA и M2 вирусов гриппа А, а также генов НА и NA вирусов гриппа В. Использовались праймеры, образующие в процессе амплификации набор перекрывающихся фрагментов ПЦР:

NAF22H3N2 gcaggggataattctattaaccatg, HAR683H3N2 gittgttgctctcttttgtag, HAF399H3N2 actggagtttaiciatgaaagcttc, HAR1080H3N2 ctcccaccattttctatgaaacc, HAF892H3N2 atcactccaatggaagcatcc, HAR1723H3N2 caaggtgttttaattaatgcacic, NAFH3N2 ccagcagaatacagaattggctc, NARH3N2 gagaataaccagaataaccggacc, HA1F1B atgaaggcaataattgtactact, HA1RB caatggcttgggctgctc, HA2FB gaacctcaggtcttcgccta, HA2R1B atgggaaggaatgattgcagg, HAF954B caaaagcaagccttactacacag, HAR1759B cccttatagacagatggagc, NAFB ctctcagaagcactcctaattagc, NARB gtaccatytctatcccaatacagg.

ПЦР выполняли на приборах «Терцик» (ДНК-технология) с использованием реагентов производства «АмплиСенс» (ЦНИИЭ). Секвенирование фрагментов ПЦР осуществлялось методом «cycle sequence» с набором ABI PRISM Big Dye™ v.3.1 (Applied Biosystems, США) на секвенаторе ABI-3100 PRIZM™ Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Анализ нуклеотидных последовательностей выполнялся с использованием блока программ DNASTAR.

Секвенирование вируса А/Moscow/CRIE-141/2015(H3N2) проводилось методом полногеномного секвенирования (MiSeq, Illumina). Получение ДНК-библиотек проводилось с помощью оригинальной методики с использованием реагентов производства «АмплиСенс» (ЦНИИЭ). Секвенирование ДНК-библиотек проводили на приборе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора «MiSeq Reagent Kits V2 (250PE)». Обработку данных полногеномного секвенирования, сборку контигов и картирование ридов осуществляли с помощью программы «CLC Genomics Workbench 3.6.5» (CLC bio, США).

Филогенетический анализ проводился с помощью программы BioNumerics v.6.5. методом Neighbour-Joining с выполнением Bootstrap Test of Phylogeny (1000 репликаций).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В сезонах 2013 — 2014 и 2014 — 2015 гг. был проведен анализ методом секвенирования клинических образцов вирусов гриппа А/Н3N2 и гриппа В, обнаруженных в европейской части России. В сезоне 2013 — 2014 гг. проанализировано: 10 полных сегментов гемагглютинина (НА); 6 фрагментов гена нейраминидазы (NA), 10 полных сегментов МР вирусов гриппа А субтипа А/Н3N2; 2 полных сегмента НА, 2 фрагмента гена NA вирусов гриппа В. В сезоне 2014 — 2015 гг. проанализировано: 70 полных сегментов НА; 8 полных сегментов NA, 44 фрагмента гена NA вирусов гриппа А субтипа А/Н3N2; 29 полных сегментов НА, 28 фрагментов гена NA вирусов гриппа В.

Последовательности нуклеотидов депонированы в базу данных GISAID EpiFlu™. Сезон 2013 — 2014 гг.: Influenza virus A/H3N2: EPI545223-EPI545226, EPI545228, EPI545229, EPI545231-EPI545233, EPI545235, EPI545255, EPI545256, EPI545258-EPI545260, EPI545263, EPI545266, EPI545275, EPI545350-EPI545352, EPI545572, EPI545573, EPI547700-EPI547702; Influenza virus B: EPI545298, EPI545325, EPI545400, EPI548481. Сезон 2014 — 2015 гг.: Influenza virus A/H3N2: EPI623748, EPI623749, EPI623754, EPI623755, EPI623757, EPI623759, EPI623762, EPI623763, EPI623765, EPI623766, EPI623770, EPI623771, EPI623774, EPI623776, EPI623780, EPI623781, EPI623783-EPI623786, EPI623789, EPI623790, EPI623792, EPI623794, EPI623797-EPI623799, EPI623804-EPI623808, EPI623813-EPI623816, EPI623822, EPI623826-EPI623836, EPI623839-EPI623847, EPI623852, EPI623853, EPI623865, EPI623868, EPI623870, EPI623877, EPI623878, EPI623880, EPI623882, EPI623884, EPI623885, EPI623888, EPI623890, EPI623894, EPI623895, EPI623898, EPI623899, EPI623903, EPI623910-EPI623913, EPI638285,



EPI638286-EPI638288, EPI623914-EPI623929, EPI638289-EPI638296, EPI623930-EPI623933, EPI623936, EPI623945-EPI623958; Influenza virus B: EPI638433-EPI638450, EPI643153-EPI643191.

Последовательности нуклеотидов полного генома вируса A/Moscow/CRIE-141/2015(H3N2) депонированы в базу данных GenBank: KU198896-KU198903.

Результаты секвенирования генов HA вирусов A/H3N2 сезона 2013 — 2014 гг. показали их принадлежность к вирусу гриппа А субтипа H3N2 с высокой гомологией (98,6 — 99,0%) с вакцинным штаммом сезона 2013 — 2014 гг. A/Texas/50/2012(H3N2) [20]. В сезоне 2014 — 2015 гомология вирусов, обнаруженных в РФ, с вакцинным штаммом снизилась (97,4 — 98,1%). Процент гомологии по нуклеотидному составу NA вирусов, по сравнению с вакцинным штаммом, был достаточно высок и практически не изменился за 2 сезона (сезон 2013 — 2014: 98,9 — 99,6%; сезон 2014 — 2015: 98,3 — 99,1%).

Среди современных вирусов гриппа А субтипа H3N2 выделяют несколько генетических групп — клейдов [15], которые отмечены на рис. 1, с. 65: «Дендрограмма по гену гемагглютинаина вирусов гриппа А субтипа H3N2 (данные ECDC, Референс-центра ЦНИИЭ 2013 — 2015 гг.). A/Texas/50/2012 — вакцинный штамм сезонов 2013 — 2014 и 2014 — 2015 гг. На дендрограмме показаны аминокислотные замены в HA1 субъединице гемагглютинаина, курсивом с подчеркиванием выделены замены в HA2 субъединице HA».

Состав аминокислот в структуре HA исследованных вирусов и их соответствие определенным клейдам представлено в табл.

Вирусы, обнаруженные в сезоне 2013 — 2014 гг., принадлежали к следующим клейдам: 3C.3 (8 вирусов, 80%), 3C.3b (1 вирус, 10%), 3C.2a (1 вирус, 10%); в сезоне 2014 — 2015 гг. превалировал субклеид 3C.2a — 81% (57 вирусов), также встречались субклеид 3C.3a — 10% (7 вирусов), субклеид 3C.3b — 9% (6 вирусов). Вакцинный штамм A/Texas/50/2012 отнесен к клейду 3C.1.

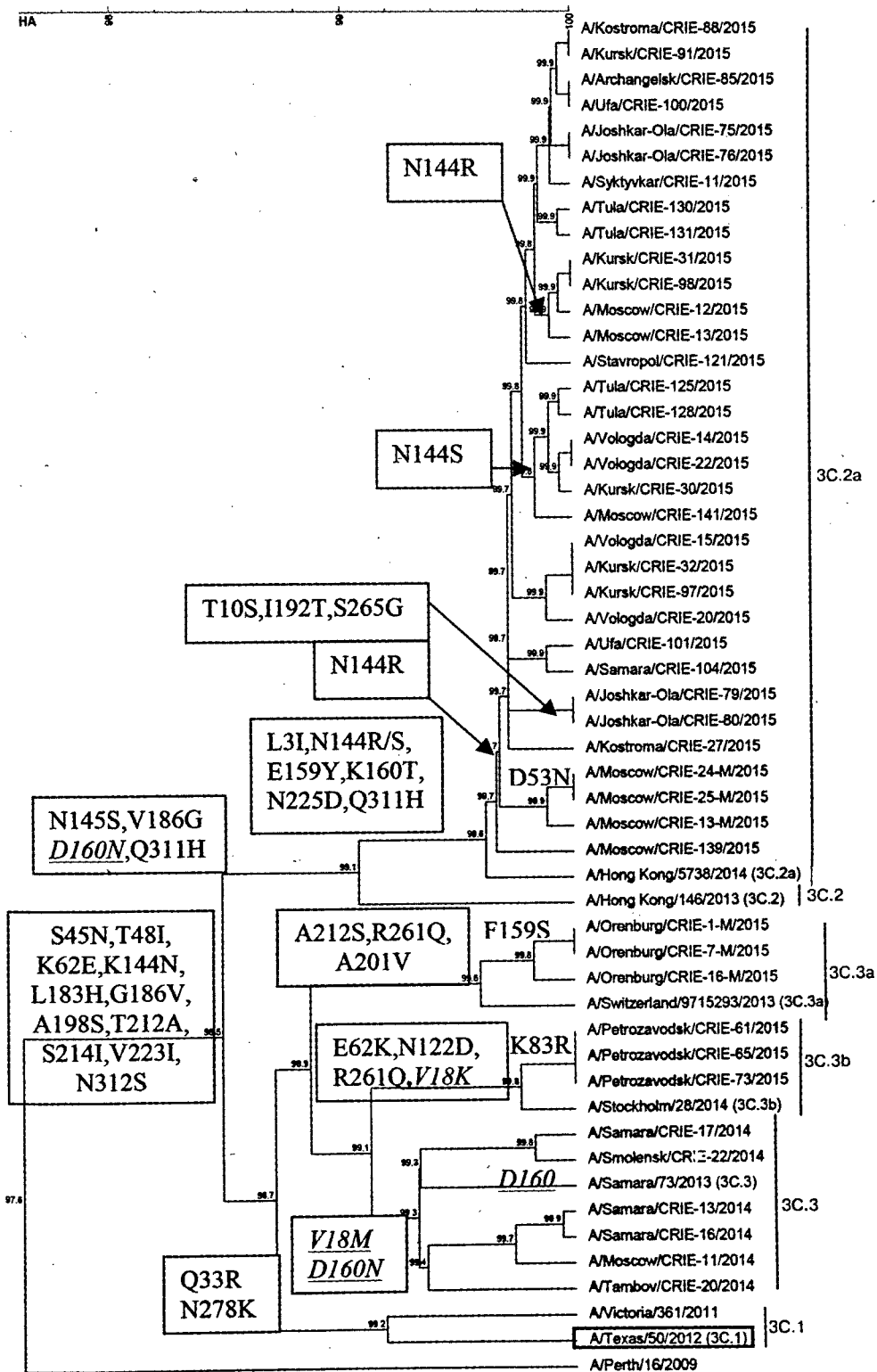
Начиная с сезона 2012 — 2013 гг. внутри группы 3C сформировались 3 клейда с характерными аминокислотными заменами: 3C.1 (Q33R, S145N and N278K), 3C.2 (как в 3C.1 + N145S), 3C.3 (как в 3C.2 + T128A (-CHO) (утрата потенциального сайта гликозилирования), R142G) [11].

В сезоне 2013 — 2014 гг. произошло их дальнейшее подразделение на субклеиды: 3C.2a, 3C.3a и 3C.3b. Характерные аминокислотные замены субклеидов вирусов гриппа А/H3N2 [21]: 3C.2a: L31, N144S (-CHO), N145S, F159Y, K160T (+CHO) (приобретение потенциального сайта гликозилирования), V186G, N225D, Q311H; 3C.3a: T128A (-CHO), A138S, R142G, N145S, F159S, V186G, N225D; 3C.3b: E62K, K83R, N122D (-CHO), T128A (-CHO), R142G, N145S, L157S, V186G (в HA1) и M18K (в HA2).

Все вирусы гриппа А субтипа H3N2, обнаруженные в России в сезоны 2013 — 2014 и 2014 — 2015 гг., принадлежащие к клейдам 3C.2 и 3C.3 и производным от них субклеидам 3C.2a, 3C.3a, 3C.3b, имели три аминокислотные замены: N53D, N145S, P198S. (табл.). Исключение составляли 4 вируса, обнаруженные в Москве в сезоне 2014 — 2015 гг., не несущие мутацию N53D.

Замены N53D, N145S находятся в антигенном сайте А [14], P198S — в антигенном сайте Е [14]. По литературным данным известно, что замена N145S играет ключевую роль в ускользании вируса от иммунного ответа организма человека. Аминокислотное положение 145 находится в локусе, вовлеченном во взаимодействие с клеточным рецептором. Аминокислотный остаток в 145 положении является одним из семи остатков, имеющих основное значение в антигенном дрейфе вирусов гриппа А субтипа H3 у людей [13].

В сезоне 2013 — 2014 гг. в России доминировали вирусы, принадлежавшие





к клайду 3С.3, подобные вакцинному штамму А/Texas/50/2012. По нашим данным в сезоне 2013 — 2014 гг. только 1 вирус (10%) принадлежал к субклайду 3С.2а и один вирус (10%) являлся дрейф-вариантом этого клайда — 3С.3б.

Вирусы гриппа сезона 2014 — 2015 гг. отличались значительным генетическим разнообразием. Подавляющее большинство (81%) исследованных нами вирусов гриппа А/Н3N2 были генетически родственны штамму А/Hong Kong/5738/2014, представителю субклайда 3С.2а. Доля вирусов, относящихся к субкладам 3С.3б и 3С.3а, являющихся эволюционным продолжением 3С.3 клайда, соответствовала 9% и 10%.

Значимых различий по нуклеотидным последовательностям НА и NA между вирусами гриппа, выявленными у больных с разными исходами заболевания, обнаружено не было.

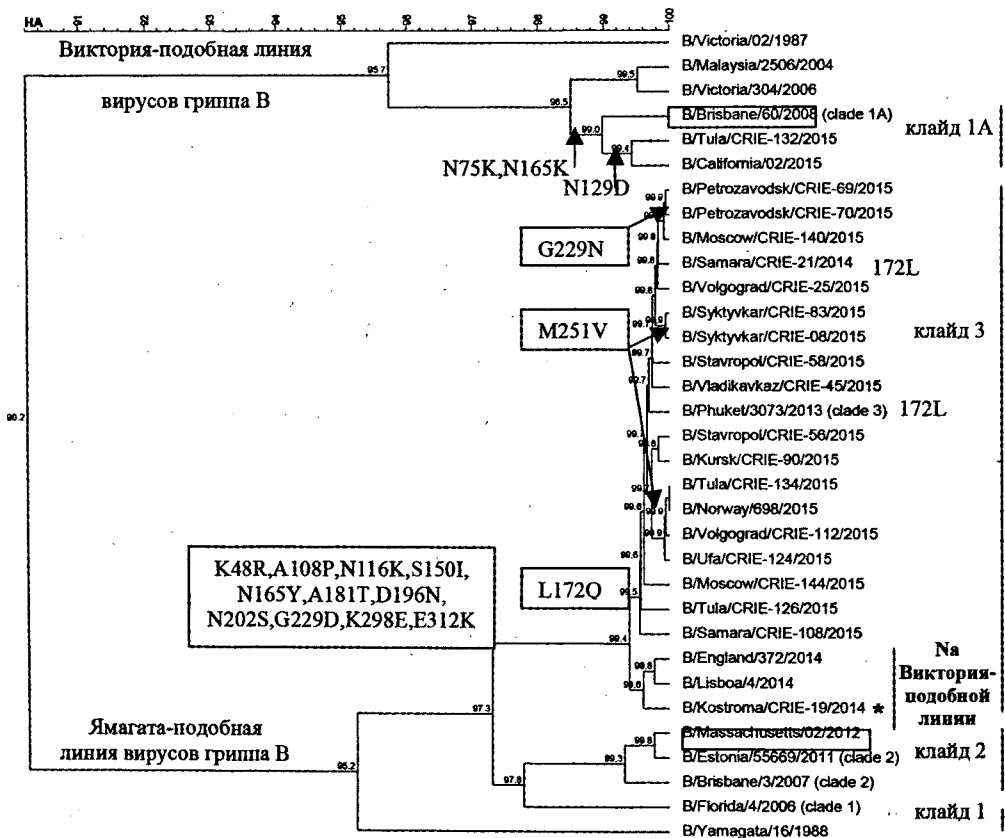
Практически все вирусы, обнаруженные в России в сезонах 2013 — 2014 и 2014 — 2015 гг. и относящиеся к 3С.3 клайду, имели в НА аминокислотные замены: T128A (у 91% образцов), R142G (у 100%). Замена T128A приводит к утрате потенциального сайта гликозилирования. Замена R142G, находящаяся в антигенном сайте А, приводит к смене заряда аминокислотного остатка. Она была характерна для вирусов, выделенных в предыдущие сезоны. Отмечена циркуляция вирусов, содержащих замену L157S в антигенном сайте В1, а также в субъединице НА2: замены V18M или V18K и N160D.

Отдельную группу составили вирусы, обнаруженные в Оренбурге в сезоне 2014 — 2015 гг. (10% от всех вирусов А/Н3N2 этого сезона), подобные штамму А/Switzerland/9715293/2013, рекомендованному ВОЗ для производства вакцин в сезоне 2015 — 2016 гг., они отнесены к субклайду 3С.3а. Для этих вирусов были характерны аминокислотные замены: A138S, F159S (антигенный сайт В), N225D, K326R, A201V. Замена A138S, находящаяся в антигенном сайте А, была зарегистрирована всего у 6,6% вирусов (от всех вирусов гриппа А/Н3N2, депонированных в базы GenBank, GISAID. [2]. Мутация A138S является доминантным фактором, определяющим эффективность заражения вирусами гриппа А/Н3N2 эпителиальных клеток дыхательных путей свиней [7].

Другая группа была образована шестью вирусами из девяти, обнаруженными в Петрозаводске. По генетическим характеристикам эти вирусы относились к субклайду 3С.3б, представителем которого, является штамм А/Stockholm/28/2014. У данных вирусов присутствовали характерные для этого субклайда замены: E62K, K83R, N122D, L157S, R261Q и V18K. Замены E62K, K83R, R261Q расположены в антигенном сайте Е, L157S — в антигенном сайте В. Замена N122D, находящаяся в антигенном сайте А, приводит к утрате потенциального сайта гликозилирования. N122D была отмечена всего у 12% вирусов, зарегистрированных в базах данных, преимущественно в США [1].

Российские вирусы гриппа в сезоне 2014 — 2015 гг., имели ряд замен в НА, общих для субклайда 3С.2а: L3I, N53D, N144R/S, N145S, F159Y, K160T, P198S, N225D, Q311H.

В Европе в сезоне 2014 — 2015 гг. преобладали вирусы, принадлежавшие к субкладам 3С.3а и 3С.3б (ECDC). В России преобладающее большинство вирусов относилось к субклайду 3С.2а, и в значительно меньшем количестве в почти равной пропорции встречались вирусы 3С.3а и 3С.3б субклайдов. В сезоне 2014 — 2015 гг. произошел антигенный дрейф вируса гриппа А/Н3N2 — появились новые аминокислотные замены в НА1 домене гемагглютинаина по отношению к вакцинному штамму А/Texas/50/2012 (клайд 3С.1). Большая



часть вирусов гриппа А/Н3N2 в Европе и США сезона 2014 — 2015 гг. принадлежала к субклайду 3С.3а, в связи с чем ВОЗ рекомендовала заменить вакцинный штамм А/Texas/50/2012 на А/Switzerland/9715293/2013 на сезон 2015 — 2016 гг. для северного полушария [20].

В России субклайд 3С.3а появился только в сезоне 2014 — 2015 гг., и на его долю приходилось только 10% по данным этого исследования. Наши данные коррелируют с результатами, полученными в НИИ гриппа по эпидсезону 2014 — 2015 гг.: к 3С.3а субклайду принадлежали 12,4 % от общего числа вирусов гриппа А/Н3N2 [3].

Во всех исследованных вирусах, обнаруженных в сезоне 2013 — 2015 гг., в белке М2 выявлена мутация устойчивости к ремантадину S31N. При анализе последовательностей NA вирусов гриппа А субтипа А/Н3N2 не найдены известные мутации, определяющие устойчивость к озельтамивиру: E119V, I222V, R292K, N294S, del245-248, Q136K [23].

В сезоне 2013 — 2014 гг. среди исследованных образцов были выявлены только вирусы гриппа В, принадлежавшие к линии Ямагата. В сезоне 2014 — 2015 гг. один вирус принадлежал к линии Виктория, 28 вирусов — к линии Ямагата. Гомология представителей линии Ямагата по генам как NA (2013 — 2014: 97,4 — 97,9%, 2014 — 2015: 97,3 — 97,8%), так и NA (2013 — 2014: 95,2 — 97,4%, 2014 — 2015: 97,1 — 98,2%) с вакцинным штаммом В/Massachusetts/02/2012 (входит в состав трехвалентной вакцины) была невысокой в

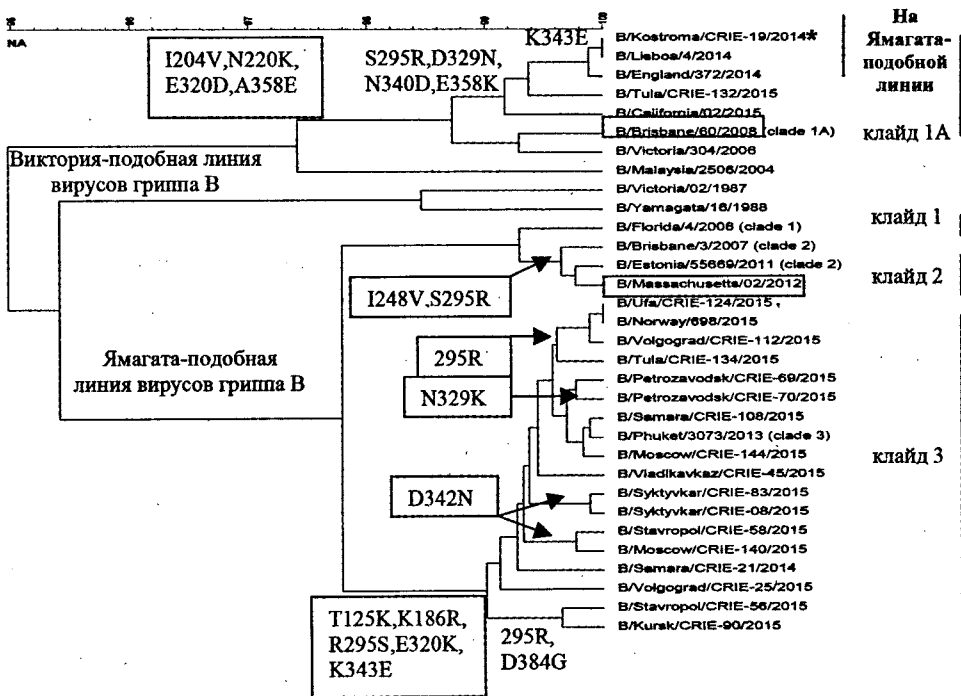


Рис. 2А, с. 68. Дендрограмма по гену гемагглютинина (НА) вирусов гриппа В. Рис. 2Б, с. 69. Дендрограмма по гену нейраминидазы (NA) вирусов гриппа В. Вакцинные штаммы сезонов 2013 — 2014 и 2014 — 2015 гг.: В/Massachusetts/02/2012 — Ямагата-подобной линии вирусов гриппа В, В/Brisbane/60/2008 — Виктория-подобной линии вирусов. На дендрограмме показаны аминокислотные замены в HA1 субъединице гемагглютинина. В/Kostroma/CRIE-19/2014 \* вирус-реассортант по НА (линия Ямагата) и NA (линия Виктория).

оба эпидемические сезона (табл.). Напротив, один Виктория-подобный вирус, исследованный в данной работе, показал высокую гомологию с вакцинным штаммом этой линии В/Brisbane/60/2008 (добавочный компонент четырехвалентной вакцины) как по нуклеотидному составу гена НА (99,3%), так и фрагмента гена NA (98,9%).

Вирусы гриппа А и В занимают одну нишу, что вызывает неизбежное взаимодействие и конкурирование одних типов вирусов с другими. На протяжении последних десятилетий отмечается динамическое преобладание определенных филогенетических линий вирусов гриппа, на основе чего делаются попытки выявить закономерности смены одних линий вирусов гриппа другими в этиологической структуре гриппа. При анализе распределения типов вирусов гриппа в США с 1976 по 2007 г. [9] четкой закономерности выявлено не было. Однако было отмечено, что вирус гриппа А/Н3N2 доминировал в этиологической структуре примерно через каждые 3 — 4 сезона. Преобладание вируса гриппа В отмечалось реже, примерно через 4 — 5 сезонов. Относительно вируса гриппа В была отмечена интересная закономерность, так называемое «горлышко бутылки»: смена доминирования Виктория-подобных и Ямагата-подобных антигенных линий гриппа происходила в тот момент (или сразу после него), когда в доля вируса гриппа В в структуре гриппа была очень мала (<0,2%) [9]. Такие сезоны регистрировались в 1993 — 1994, 1997 — 1998, 1999 — 2000, 2003 — 2004 гг.

В России в сезонах 2013 — 2014, 2014 — 2015 гг. обнаруженные вирусы гриппа В, принадлежащие к линии Ямагата, относились к клайду 3 (номенклатура клайдов дана в соответствии с US CDC [21]) (рис. 2).

Вакцинный штамм В/Massachusetts/2/2012 принадлежит к клайду 2. Все исследованные российские вирусы обоих сезонов имели аминокислотные замены в гемагглютинине: K48R, A108P, N116K, S150I, N165Y, A181T, D196N, N202S, G229D, K298E, E312K. Все данные замены характерны для клайда 3. Они присутствовали у референсного штамма клайда 3 — В/Phuket/3073/2013. В сезоне 2015 — 2016 гг. ВОЗ приняла решение о замене вакцинного штамма гриппа В/Massachusetts/2/2012 на В/Phuket/3073/2013 [20] той же линии Ямагата.

В молекуле гемагглютинина вируса гриппа В выделяют четыре антигенно значимых домена — петля 120 и прилегающие регионы HA1 (116 — 137), петля 150 HA1 (141 — 150), петля 160 HA1 (162 — 167), а также спираль 190 HA1 (194 — 202) и окружающие ее области. Установлено, что эта молекула содержит шесть антигенных сайтов: VA, VB1, VB2, BC, BD и BE [19].

Особенно важное значение имеет ряд аминокислотных замен, обнаруженных у всех российских вирусов: N116K (петля 120), S150I (петля 150), N165Y (петля 160), D196N и N202S (спираль 190). Кроме того, аминокислотная замена D196N влияет на появление потенциального сайта гликозилирования, что приводит к изменению структуры поверхностного гемагглютинина. У 3 вирусов, обнаруженных у больных в Петрозаводске, выявлена мутация G229N. В российских вирусах, обнаруженных в сезоне 2014 — 2015 гг., найдена аминокислотная замена L172Q, в сезоне 2013 — 2014 гг. она не отмечалась. Данная аминокислотная замена обнаруживается у 53% вирусов гриппа В во всем мире. Аминокислотная замена M251V была обнаружена у 1 образца (50%) в сезоне 2013 — 2014 гг. А в последующем сезоне 2014 — 2015 гг. M251V выявлялась у 57% российских вирусов.

Только один вирус, обнаруженный в сезоне 2014 — 2015 гг. (В/Tula/CRIE-132/2015), принадлежал к викторианской линии вирусов гриппа В к клайду 1А, который циркулирует с 2009 года по настоящее время. По сравнению с вакцинным штаммом викторианской линии сезонов 2013 — 2015 гг. В/Brisbane/60/2008, вирус В/Tula/CRIE-132/2015 имел аминокислотные замены: N129D (петля 120), I146V (петля 150), D196N (спираль 190, появление потенциального сайта гликозилирования). Все данные замены влияют на изменение антигенных свойств вируса гриппа, но серьезных изменений в антигенной структуре вирусов за сезоны 2013 — 2015 гг. не произошло. По рекомендациям ВОЗ, добавочный компонент для четырехвалентной вакцины В/Brisbane/60/2008 остался неизменным на сезон 2015 — 2016 гг. [20].

Одним из механизмов эволюции вирусов гриппа В является реассортация между вирусами обеих линий. В сезоне 2014 — 2015 гг. подобные вирусы, реассортанты по генам HA и NA, обнаруживались в разных частях света: Европа, Азия, Африка [12]. В нашей выборке вирус В/Kostroma/CRIE-19/2014, обнаруженный в сезоне 2014 — 2015 гг., является реассортантом, содержащим HA линии Ямагата, и NA — линии Виктория.

Проведенное исследование показало, что с сезона 2013 — 2014 гг. возросло генетическое разнообразие циркулировавших в России вирусов гриппа А/Н3N2 и В, которое еще больше увеличилось в сезоне 2014 — 2015 гг., в результате чего в циркуляции появились вирусы, значительно отличающиеся по антигенным характеристикам от циркулировавших ранее и от вошедших в вакцину, рекомендованную на сезон 2014 — 2015 гг. компонентов А/Н3N2 и В. Такая ситуация была благоприятна для увеличения заболеваемости гриппом

по сравнению с предыдущим эпидемическим сезоном, поскольку анамнестический и вакцинальный иммунитет обеспечивали лишь частичную перекрестную защиту. В связи с этим, ВОЗ приняла решение о замене вакцинных компонентов вируса гриппа А/Н3N2 и В в составе трехвалентной вакцины на сезон 2015 — 2016 гг.

Одновременная циркуляция двух значительно отличающихся по антигенным свойствам линий вируса гриппа В и появление их реассортантов свидетельствует о целесообразности применения четырехвалентной вакцины, включающей антигенные компоненты обеих линий вируса гриппа В.

Во всех исследованных вирусах гриппа А/Н3N2 сезонов 2013 — 2015 гг. была выявлена мутация устойчивости к ремантадину S31N (белок М2). Все исследованные вирусы гриппа А/Н3N2 и В не имели известных мутаций в гене NA, определяющих устойчивость к озельтамивиру.

*БЛАГОДАРНОСТИ:* Авторы выражают благодарность за сотрудничество и предоставление биологического материала, использованного в данной работе, главным врачам и заведующим отделами и лабораториями Центров гигиены и эпидемиологии регионов РФ, в которых выполнялись первичные исследования по обнаружению и выделению вирусов гриппа: Иваненко А.В., Ярмольская М.С., Соломащенко Н.И., Хализева В.А., Спиридонов А.М., Шелокова В.Г., Гнатив Б.Р., Аникеева Л.В., Лимин Б.В., Алексеева Е.А., Зорина Д.М., Разумовский С.Л., Денисова Л.Н., Барышникова А.С., Ковальчук М.Л., Шевцова Ю.А., Пахомова Т.Н., Исаева А.А., Бастраков С.И., Гурьева Л.П., Болтенков В.П., Шишко Л.А., Казак А.А., Сыса А.М., Болдырева В.В., Серегина И.В., Чайка А.Н., Русакова Н.В., Лесникова М.В., Бутаев А.К., Мамиева С.Ч., Тихонова Г.Д., Агафонова Т.В., Сидоренкова Л.М., Михайлова И.Е.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. База данных GISAID EpiFluTM. Электронный ресурс [http://flusurver.bii.a-star.edu.sg/MUTATIONS/H3N2\\_Human\\_2013\\_Switzerland9715293/HA\\_138\\_stat.html](http://flusurver.bii.a-star.edu.sg/MUTATIONS/H3N2_Human_2013_Switzerland9715293/HA_138_stat.html).
2. База данных GISAID EpiFluTM. Электронный ресурс [http://flusurver.bii.a-star.edu.sg/MUTATIONS/H3N2\\_Human\\_2013\\_Switzerland9715293/HA\\_154\\_stat.html](http://flusurver.bii.a-star.edu.sg/MUTATIONS/H3N2_Human_2013_Switzerland9715293/HA_154_stat.html).
3. Данные НИИ гриппа. Эпидемиологическая ситуация. Лабораторная диагностика гриппа и ОРВИ. [http://www.influenza.spb.ru/system/epidemiological\\_situation/laboratory\\_diagnostics/?year=2015&week=22](http://www.influenza.spb.ru/system/epidemiological_situation/laboratory_diagnostics/?year=2015&week=22).
4. Письмо Роспотребнадзора от 30.06.2014 № 01/7281-14-32. Об итогах эпидсезона по гриппу и ОРВИ 2013/2014. <http://rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/088/pismo-po-itogam-sezona-gripp.pdf>.
5. Письмо Роспотребнадзора от 28.07.2015 № 1042. Об итогах эпидсезона по гриппу и ОРВИ 2014/2015гг и задачах на предстоящий эпидсезон 2015/2016 гг. [www.stupeni15.edusite.ru/DswMedia/itogigripp-2015.doc](http://www.stupeni15.edusite.ru/DswMedia/itogigripp-2015.doc).
6. Ambrose C.S., Levin M.J. Therationale for quadrivalent influenza vaccines. Hum. Vaccin. Immunother. 2012, 8 (1): 81-88.
7. Busch M.G., Bateman A.C., Landolt G.A. et al. Identification of amino acids in the HA of H3 influenza viruses that determine infectivity levels in primary swine respiratory epithelial cells. Virus Res. 2008, 133 (2): 269-279.
8. Chen J.M., Guo Y.J., Wu K.Y. et al. Exploration of the emergence of the Victoria lineage of influenza B virus. Arch. Virol. 2007, 152 (2): 415-422.
9. Chen R., Holmes E.C. The evolutionary dynamics of human influenza B virus. J. Mol. Evol. 2008, 66 (6): 655-663.
10. Cockburn W.C., Delon P.J., Ferreira W. Origin and progress of the 1968-69 Hong Kong influenza epidemic. Bull. World Health Organ. 1969, 41 (3): 345-348.
11. ECDC European Centre. Influenza virus characterization summary Europe, July 2012. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/CNRL-July-2012.pdf>.
12. ECDC European Centre. Influenza virus characterization summary Europe, July 2015. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/influenza-virus-characterisation-july-2015.pdf>.
13. Koel B.F., Burke D.F., Bestebroer T.M. et al. Substitutions near the receptor binding site de-



- termine major antigenic change during influenza virus evolution. *Science*. 2013, 342 (6161): 976-979.
14. Lee M-S., Chen J. S-E. Predicting antigenic variants of influenza A/H3N2 viruses. *Emerg. Infect. Dis.* 2004, 10 (8): 1385-1390.
  15. Morbidity and Mortality Weekly Report. CDC Centers, USA. <http://www.cdc.gov/mmwr>.
  16. Review of the 2012–2013 winter influenza season, northern hemisphere. *Weekly Epidemiol. Rec.* 2013, 88 (22): 225-232.
  17. Rota P.A., Wallis T.R., Harmon M.W. et al. Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983. *Virology*. 1990, 175 (1): 59-68.
  18. Smith D.J., Lapedes A.S., de Jong J.C. et al. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. *Science*. 2004, 305 (5682): 371-376.
  19. Wang Q., Tian X., Chen X., Ma J. Structural basis for receptor specificity of influenza B virus hemagglutinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007, 104 (43): 16874-16879.
  20. WHO Influenza Centre, London. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2013-14 (2014-15) (2015-16) northern hemisphere influenza season. [http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2013\\_14\\_north/en/](http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2013_14_north/en/) (2014\_15), (2015\_16).
  21. WHO Influenza Centre, London. Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Northern Hemisphere 2015/16. 23rd –25th February 2015.
  22. WHO Influenza Centre, St Petersburg, Russia. Digest of Influenza Surveillance in Russia, Seasons 2009–2013. <http://www.influenza.spb.ru/files/rii-digest-2013.pdf>.
  23. WHO. Summary of neuraminidase amino acid substitutions associated with reduced inhibition by neuraminidase inhibitors. [http://www.who.int/influenza/gisrs\\_laboratory/antiviral\\_susceptibility/avwg2014\\_nai\\_substitution\\_table.pdf](http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/antiviral_susceptibility/avwg2014_nai_substitution_table.pdf).

Поступила 23.02.16

Контактная информация: Яцышина С.Б., к.б.н.,  
111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а, р.т. (495)672-11-58

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*М.Х.Альева<sup>1</sup>, С.Я.Зверев<sup>1,2</sup>, И.В.Фельдблюм<sup>1</sup>,  
Е.Ю.Носкова<sup>2</sup>, А.О.Канина<sup>3</sup>, Н.И.Маркович<sup>4</sup>*

## **АССОЦИАЦИЯ НЕКОТОРЫХ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ СИСТЕМЫ АПОПТОЗА С РИСКОМ РАЗВИТИЯ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА В РОССИЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ**

<sup>1</sup>Пермский государственный медицинский университет; <sup>2</sup>Пермский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями; <sup>3</sup>Пермский краевой онкологический диспансер; <sup>4</sup>ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения, Пермь

**Цель.** Изучить влияние однонуклеотидных полиморфизмов генов TP53 (rs1042522, rs1800371), CDKN2A (rs3731217, rs3088440) и MDM2 (rs2279744) на риск развития колоректального рака (КРР) у жителей Пермского края. **Материалы и методы.** Группу случай составили 198 пациентов с гистологически верифицированным КРР, контрольную группу — 205 человек, у которых КРР исключен по результатам колоноскопии. Генотипирование ДНК, полученной из лейкоцитов венозной крови исследуемых, проводили методом ПЦР с электрофоретической детекцией результатов. **Результаты.** Выявлены значительные межпопуляционные различия частоты встречаемости аллелей rs1042522, rs3088440, rs2279744 в российской популяции по сравнению с восточноазиатской и европейской ( $p < 0,0001$ ). Установлена ассоциация гетерозиготного (G/T) генотипа rs2279744 с более низким риском развития КРР независимо от пола и возраста (отношение шансов=0,51, 95% доверительный интервал=0,26 — 0,97). Не определены статистически достоверные связи между развитием КРР и другими полиморфизмами. **Заключение.** Впервые изучена связь полиморфизмов генов системы апоптоза с риском

развития КРР среди российской популяции. Полученные данные свидетельствуют о вероятном снижении риска развития КРР при носительстве гетерозиготного генотипа полиморфизма rs2279744.

Журн. микробиол., 2016, № 5, С. 72—80

Ключевые слова: рак толстой кишки, SNPs, апоптоз, TP53, CDKN2A, MDM2

*M. Kh. Alyeva<sup>1</sup>, S. Ya. Zverev<sup>1,2</sup>, I. V. Feldblyum<sup>1</sup>,  
E. Yu. Noskova<sup>2</sup>, A. O. Kanina<sup>3</sup>, N. I. Markovich<sup>4</sup>*

## ASSOCIATION OF CERTAIN SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM GENES OF APOPTOSIS SYSTEM WITH A RISK OF DEVELOPMENT OF COLORECTAL CANCER IN RUSSIAN POPULATION

<sup>1</sup>Perm State Medical University; <sup>2</sup>Perm Regional Centre for Prophylaxis and Control of AIDS and Infectious Diseases; <sup>3</sup>Perm Regional Oncologic Dispensary; <sup>4</sup>Federal Scientific Centre of Medical-Prophylaxis Technologies of Population Health Risk Management, Perm, Russia

*Aim.* Study the effect of single nucleotide polymorphism genes TP53 (rs1042522, rs1800371), CDKN2A (rs3731217, rs3088440) and MDM2 (rs2279744) on the risk of development of colorectal cancer (CRC) in population of Perm Region. *Materials and methods.* Case group consisted of 198 patients with histologically verified CRC, control group — 205 individuals with CRC excluded by results of colonoscopy. DNA genotyping, obtained from leukocytes of venous blood of the studied individuals, was carried out by PCR with electrophoretic detection of results. *Results.* Significant inter-population differences of frequency of occurrence of alleles rs1042522, rs3088440, rs2279744 in Russian population compared with East-Asian and European were detected ( $p < 0.0001$ ). Association of heterozygote (G/T) genotype rs2279744 with a lower risk of development of CRC regardless of sex and age (OR=0.51, 95% CI=0.26 — 0.97) was established. Statistically significant relations between development of CRC and other polymorphisms were not determined. *Conclusion.* Relations of gene polymorphism of apoptosis system with risk of development of CRC in Russian population was studied for the first time. The data obtained give evidence on the probable reduction of risk of development of CRC with carriage of heterozygote genotype of polymorphism rs2279744

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 5, P. 72—80

Key words: colon cancer, SNPs, apoptosis, TP53, CDKN2A, MDM2

## ВВЕДЕНИЕ

Злокачественные новообразования (ЗНО) вследствие высокой распространенности, заболеваемости и неэффективной профилактики продолжают оставаться одной из наиболее актуальных медико-социальных проблем.

Одной из ведущих нозологических форм среди онкологических заболеваний в экономически развитых странах как по уровню заболеваемости, так и по уровню смертности на современном этапе является колоректальный рак (КРР). Риск развития КРР в равной степени относится к мужчинам и женщинам, увеличиваясь в каждую последующую декаду жизни и достигая наибольшего уровня в возрастных группах старше 60 лет. Заболеваемость КРР на территории России характеризуется неуклонной умеренной тенденцией к росту [3].

По данным многочисленных исследований на риск развития КРР оказывают влияние много факторов, которые условно можно разделить на 2 типа: корригируемые и некорригируемые (генотипические).

Предполагается, что первопричиной злокачественного роста являются именно генетические аномалии, приводящие к нарушению управления про-

цессом деления клеток. В норме количество клеток регулируется посредством точной балансировки двух противоположных процессов — клеточного деления и клеточной элиминации. Характерной чертой почти всех опухолей является прибавление клеточной массы, опережающее клеточную гибель либо за счет активации процессов пролиферации, либо вследствие угнетения процессов программируемой клеточной гибели (апоптоза), а чаще всего за счет сочетанного нарушения обоих этих процессов [2].

Прогресс молекулярных технологий, получивших стремительное развитие с конца XX века, позволяет выявлять различные молекулярные нарушения в опухолях. Среди различных генетических аномалий, оказывающих возможное влияние на риск возникновения злокачественных новообразований, важную роль могут играть однонуклеотидные полиморфизмы (SNPs, single nucleotide polymorphisms). Они представляют собой единичные изменения в нуклеотидной последовательности ДНК, происходящие с частотой приблизительно 1 на 1000 пар оснований. Практический интерес к SNPs определяется тем, что наличие такой замены может вызвать изменение структуры или функции кодируемого определенным геном белка, в том числе стабильности связывания с субстратом и промежуточными метаболитами, посттрансляционными модификациями.

К настоящему моменту опубликованы исследования о более 3600 вариантах полиморфизмов в 1378 независимых генах, большинство из которых не связаны с риском развития КРР. Однако наиболее полный мета-анализ последних лет выявил ассоциации разной степени (от умеренной до сильной) между 62 вариантами SNPs и риском развития КРР [7].

Индивидуальный риск развития КРР может быть связан с полиморфизмами следующих генов, контролирующих апоптоз: TP53, гена ингибитора циклин-зависимой киназы 2A (CDKN 2A) и MDM2. Наиболее изученными являются полиморфизмы генов P53 rs1042522 (27 исследований) и MDM2 rs2279744 (7 исследований), по остальным SNPs имеются единичные исследования. Изучение ассоциации полиморфизмов генов системы апоптоза с риском развития КРР в российской популяции ранее не проводилось.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния полиморфизмов генов системы апоптоза Pro72Arg (rs1042522) и Pro47Ser (rs1800371) гена TP53, IVS1+9477G>T (rs3731217) и C580T (rs3088440) гена ингибитора циклин-зависимой киназы 2A и T410G (rs2279744) убиквитиновой лигазы гена MDM2 на риск развития КРР у жителей Пермского края.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучение факторов риска развития КРР, ассоциированных с полиморфизмами генов системы апоптоза, проводили в эпидемиологическом аналитическом выборочном исследовании случай-контроль. Исследуемая выборка репрезентативна [1]. Группу случай составили 198 пациентов с КРР, проживающих в Пермском крае (79 пациентов с раком ободочной кишки, 119 — раком прямой кишки), находившихся на хирургическом лечении по поводу данной патологии в колопроктологическом отделении многопрофильного стационара Перми. Основным критерием включения в группу случай явилось гистологическое подтверждение аденокарциномы прямой или ободочной кишки. Контрольную группу составили 205 здоровых лиц, проживающих на территории Пермского края, не состоящих в родстве с больными исследуемой группы, у которых КРР был исключен по результатам проведения колоноскопии. Критерием невключения явилось наличие в анамнезе в течение жизни

злокачественных новообразований любой локализации. Изучаемые группы были однородны по полу, возрасту, этнической принадлежности и территории проживания ( $p > 0,05$ ). У всех участников исследования было получено письменное информированное согласие.

Для определения аллельного состояния изучаемых полиморфизмов генов системы апоптоза использовали ДНК, полученную из лейкоцитов цельной венозной крови пациентов, включенных в исследование. Выделение ДНК проводили с применением реагента «ДНК-Экспресс-Кровь» производства ООО «НПФ Литех» (Москва). Генотипирование ДНК проводили методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией результатов и использованием наборов серии «SNP-экспресс» (ООО «НПФ Литех», Москва): мутация 1 белка p53 — каталожный номер 01338; мутация 2 белка p53 — каталожный номер 01341; мутация 1 CDKN2A — каталожный номер 01339; мутация 2 CDKN2A — каталожный номер 01340; мутация убиквитинового лигазы MDM2 — каталожный номер 01344.

Сравнительный анализ частоты встречаемости аллелей полиморфизмов генов среди популяции Пермского края и других популяций проведен на основании данных проекта «1000 Genomes» ([www.1000genomes.org](http://www.1000genomes.org)).

Оценка влияния исследуемых полиморфизмов на риск развития КРР выполнена с помощью программы SNPStats ([www.bioinfo.iconcologia.net](http://www.bioinfo.iconcologia.net)). Расчет показателей отношения шансов (ОШ) с 95% доверительными интервалами (ДИ) для групп и подгрупп проводился по всем пяти моделям наследственности (кододоминантной, доминантной, рецессивной, сверхдоминантной и лог-аддитивной). Наиболее значимой моделью считалась та, которая имела наименьшее значение информационного критерия Акаике (AIC). Соответствие равновесию Харди-Вайнбергера определялось при помощи критерия  $\chi^2$  для сравнения наблюдаемых и ожидаемых частот генотипов. Различия считали статистически значимыми при вероятности абсолютно случайного их характера, не превышающей 5% ( $p \leq 0,05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ частоты встречаемости аллелей исследуемых полиморфизмов среди здоровых лиц российской популяции (Пермский край) и лиц других наиболее географически близких популяций (восточноазиатской, европейской) показал, что межпопуляционные различия для полиморфизмов rs1800371 и rs3731217 статистически не значимы ( $p > 0,05$ ). Однако наблюдалась значительная генетическая дифференциация по другим полиморфизмам генов. Частота встречаемости аллеля G полиморфизма rs1042522 в российской, восточноазиатской и европейской популяциях составила соответственно 0,70; 0,29; 0,41 ( $p < 0,0001$ ); аллеля A полиморфизма rs3088440 — 0,94; 0,13; 0,08 ( $p < 0,0001$ ); аллеля G полиморфизма rs2279744 — 0,83; 0,54; 0,36 ( $p < 0,0001$ ).

Распределение частот генотипов в исследуемых группах достоверно не отличалось от распределения по закону Харди-Вайнбергера. Результаты взаимосвязи аллельных локусов генов системы апоптоза с риском развития КРР представлены в табл. 1. Наиболее значимой моделью наследования для четырех исследуемых SNPs (rs1042522, rs3731217, rs3088440, rs2279744) явилась сверхдоминантная модель, для которой значение AIC было наименьшим. Для полиморфизма rs1800371 применима только кододоминантная модель ввиду отсутствия встречаемости в анализируемой популяции гомозиготного генотипа Т/Т. Анализ ассоциации полиморфизмов генов показал статистически достоверную связь гетерозиготного (G/T) генотипа MDM2 (rs2279744) с более

Таблица 1. Связь аллельных локусов генов системы апоптоза с риском развития КРР

Модель наследования	Генотип	Группа случай, абс. (%)	Группа контроль, абс. (%)	ОШ (95% ДИ)	p	AIC
<b>rs1800371 гена TP53, n=403</b>						
Кодоминантная	C/C	198 (100)	202 (98.5)	1	0.04	558.5
	C/T	0	3 (1.5)	—		
<b>rs1042522 гена TP53, n=399</b>						
Сверхдоминантная	G/G-C/C	109 (55)	125 (62.2)	1	0.15	555.0
	C/G	89 (45)	76 (37.8)	1.34 (0.88—2.04)		
<b>rs3731217 гена CDKN2A, n=396</b>						
Сверхдоминантная	G/G-T/T	163 (83.6)	164 (81.6)	1	0.60	552.6
	G/T	32 (16.4)	37 (18.4)	0.87 (0.50—1.51)		
<b>rs3088440 гена CDKN2A, n=398</b>						
Сверхдоминантная	A/A-G/G	170 (86.3)	180 (89.5)	1	0.32	554.7
	A/G	27 (13.7)	21 (10.4)	1.36 (0.71—2.64)		
<b>rs2279744 гена MDM2, n=364</b>						
Сверхдоминантная	G/G-T/T	166 (91.2)	153 (84.1)	1	0.04	504.3
	G/T	16 (8.8)	29 (15.9)	0.51 (0.26—0.97)		

низким риском развития КРР независимо от пола и возраста (ОШ=0,51, 95% ДИ=0,26 — 0,97, p=0,04).

Не определены статистически достоверные связи между развитием КРР и следующими полиморфизмами генов системы апоптоза: TP53 (rs1042522, rs1800371) и CDKN2A (rs3731217, rs3088440) ни по одной из рассматриваемых моделей наследования.

Статистически значимые ассоциативные связи между риском развития КРР и наличием полиморфизмов rs1042522 и rs1800371 гена TP53, rs3731217 и rs3088440 гена CDKN2A и rs2279744 MDM2 в отдельных гендерных и возрастных подгруппах не выявлены (табл. 2, 3).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Генетическое разнообразие может играть существенную роль в патогенезе неинфекционных заболеваний. Следует отметить, что информация о генетическом разнообразии российской популяции в мировых базах данных (проекты 1000 Genomes и HarMap, каталог GWAS, dbSNP) практически отсутствует. Масштабные популяционно-генетические исследования свидетельствуют о наличии закономерностей распределения генофонда населения и формировании расово-континентальных групп, так межпопуляционное разнообразие составляет 10 — 15% [4].

Наиболее вероятными причинами выявленных нами различий в частоте встречаемости аллелей в российской популяции и популяциях других географических районов могли явиться малая численность обследуемых индивидов, различия в методах генотипирования и истинные межпопуляционные различия. Однако биологический эффект ассоциации полиморфизмов генов с риском развития заболеваний имеет однонаправленный характер и не зависит от этнической принадлежности, при этом относительный вклад маркера в степень риска развития патологии может отличаться вследствие влияния других генов (и их полиморфизмов) и средовых факторов [4].

Биологическая роль белка p53, продуцируемого одноименным геном, заключается в поддержании генетической однородности соматических клеток за счет остановки клеточного цикла и активации апоптоза при накоплении повреждений ДНК [5]. Среди исследуемых нами двух полиморфизмов гена TP53 наиболее изученным явился rs1042522, приводящий к замене азотистых оснований в 72 кодоне, что обуславливает аминокислотную инверсию аргинина на пролин (TP53 Arg72Pro). Структурные изменения в белке (форма TP53 Arg72) проявляются усилением функциональной активности p53 и активацией апоптоза. Несмотря на широкую изученность данного полиморфизма результаты проведенных мета-анализов до настоящего времени противоречивы и нет единого заключения о его влиянии на риск развития КРР [6, 8, 13, 14]. Результаты нашего исследования соответствуют выводам большинства мета-анализов об отсутствии ассоциаций с риском развития КРР.

Таблица 2. Связь аллельных локусов генов системы апоптоза с риском развития КРР у мужчин и женщин

Пол	Генотип	Группа случай, абс. (%)	Группа контроль, абс. (%)	ОШ (95% ДИ)	p
<b>rs1800371 гена P53, n=403</b>					
м.	C/C	76 (100)	58 (96.7)	1	0.07
	C/T	0	2 (3.3)	—	
ж.	C/C	122 (100)	141 (99.3)	1	0.26
	C/T	0	1 (0.7)	—	
<b>rs1042522 гена P53, n=399</b>					
м.	G/G	38 (50)	30 (50.9)	0.97 (0.49—1.91)	0.99
	C/G	30 (39.5)	23 (39)	1.02 (0.51—2.05)	
	C/C	8 (10.5)	6 (10.2)	1.04 (0.34—3.18)	
ж.	G/G	54 (44.3)	70 (50.4)	0.78 (0.48—1.28)	0.19
	C/G	59 (48.4)	53 (38.1)	1.52 (0.93—2.49)	
	C/C	9 (7.4)	16 (11.5)	0.61 (0.26—1.44)	
<b>rs3731217 гена CDKN2A, n=396</b>					
м.	G/G	61 (82.4)	46 (78)	1.33 (0.56—3.13)	0.08
	G/T	10 (13.5)	13 (22)	0.55 (0.22—1.37)	
	T/T	3 (4)	0	—	
ж.	G/G	98 (81)	116 (83.5)	0.84 (0.45—1.60)	0.43
	G/T	22 (18.2)	23 (16.6)	1.12 (0.59—2.13)	
	T/T	1 (0.8)	0	—	
<b>rs3088440 гена CDKN2A, n=398</b>					
м.	A/A	65 (86.7)	51 (86.4)	1.02 (0.38—2.77)	0.97
	A/G	10 (13.3)	8 (13.6)	0.98 (0.36—2.66)	
ж.	A/A	104 (85.2)	125 (89.9)	0.65 (0.31—1.36)	0.36
	A/G	17 (13.9)	12 (8.6)	1.71 (0.78—3.75)	
	G/G	1 (0.8)	2 (1.4)	0.57 (0.05—6.32)	
<b>rs2279744 гена MDM2, n=364</b>					
м.	G/G	56 (80)	38 (73.1)	1.47 (0.63—3.44)	0.20
	G/T	6 (8.6)	10 (19.2)	0.39 (0.13—1.16)	
	T/T	8 (11.4)	4 (7.7)	1.55 (0.44—5.45)	
ж.	G/G	94 (83.9)	95 (74.8)	1.76 (0.92—3.35)	0.21
	G/T	10 (8.9)	19 (15)	0.56 (0.25—1.26)	
	T/T	8 (7.1)	13 (10.2)	0.67 (0.27—1.69)	

Таблица 3. Связь аллельных локусов генов системы апоптоза с риском развития КРР в различных возрастных группах

Возраст	Генотип	Группа случай, абс. (%)	Группа контроль, абс. (%)	ОШ (95% ДИ)	p
<b>rs1800371 гена P53, n=403</b>					
<60 лет	C/C	78 (100)	68 (97.1)	1	0.08
	C/T	0	2 (2.9)	—	
>60 лет	C/C	120 (100)	134 (99.3)	1	0.26
	C/T	0	1 (0.7)	—	
<b>rs1042522 гена P53, n=399</b>					
<60 лет	G/G	36 (46.1)	37 (53.6)	0.74 (0.37—1.49)	0.14
	C/G	37 (47.4)	23 (33.3)	1.80 (0.88—3.73)	
	C/C	5 (6.4)	9 (13)	0.46 (0.11—1.62)	
>60 лет	G/G	56 (46.7)	65 (49.2)	0.90 (0.53—1.52)	0.88
	C/G	52 (43.3)	53 (40.1)	1.14 (0.67—1.94)	
	C/C	12 (10)	14 (10.6)	0.94 (0.38—2.29)	
<b>rs3731217 гена CDKN2A, n=396</b>					
<60 лет	G/G	67 (88.2)	61 (88.4)	1	0.96
	G/T	9 (11.8)	8 (11.6)	0.98 (0.31—3.05)	
>60 лет	G/G	92 (77.3)	103 (78)	0.96 (0.51—1.82)	0.05
	G/T	23 (19.3)	29 (22)	0.85 (0.44—1.64)	
	T/T	4 (3.4)	0	—	
<b>rs3088440 гена CDKN2A, n=398</b>					
<60 лет	A/A	69 (88.5)	62 (89.9)	0.87 (0.26—2.79)	0.4
	A/G	9 (11.5)	6 (8.7)	1.37 (0.41—4.95)	
	G/G	0	1 (1.4)	—	
>60 лет	A/A	100 (84)	116 (87.9)	0.73 (0.33—1.58)	0.68
	A/G	18 (15.1)	15 (11.4)	1.39 (0.62—3.13)	
	G/G	1 (0.8)	1 (0.8)	1.11 (0.01—87.80)	
<b>rs2279744 гена MDM2, n=364</b>					
<60 лет	G/G	55 (76.4)	47 (73.4)	1.17 (0.50—2.74)	0.19
	G/T	8 (11.1)	13 (20.3)	0.49 (0.16—1.40)	
	T/T	9 (12.5)	4 (6.2)	2.14 (0.56—9.98)	
>60 лет	G/G	95 (86.4)	89 (75.4)	2.06 (0.99—4.42)	0.11
	G/T	8 (7.3)	16 (13.6)	0.51 (0.18—1.35)	
	T/T	7 (6.4)	13 (11)	0.55 (0.18—1.56)	

Ген TP53 может содержать кроме SNP в 72 кодоне также редкий полиморфизм в 47 триплете (rs1800371), приводящий к замещению пролина на серин (Pro47Ser). Мутантный фенотип Ser47 затруднителен для узнавания пролин-направленной киназой и ввиду этого является гораздо менее специфичным субстратом для фосфорилирования [7]. Результаты ассоциации полиморфизма rs1800371 с риском развития КРР представлены единичными исследованиями в мировой литературе. В исследовании Sameer A.S. et al., проведенном в Индии, получены результаты, аналогичные нашим, об отсутствии статистически значимой связи с риском развития КРР при носительстве мутантного аллеля, приводящего к замене Pro→Ser в 47 положении белка p53 [12].

Ген CDKN2A относится к семейству генов-супрессоров опухолевого роста, который кодирует одновременно два белка (P16Ink4A и P14ARF), участвующих

в регуляции клеточного цикла. В нашем исследовании не были выявлены ассоциации полиморфизма rs3088440 гена CDKN2A с риском развития КРР, что согласуется с результатами Polakova V. et al., проведенном среди чешской популяции [10]. Не было обнаружено и статистически достоверной связи другого полиморфизма гена CDKN2A (rs3731217) с риском развития КРР. Между тем, подтверждена его связь с повышенным риском развития острой лимфобластной лейкемии у детей [9]. Исследования по изучению ассоциаций между rs3731217 и КРР в мировой и отечественной литературе нами не найдены.

Убиквитиновая лигаза гена MDM2 является одним из инициаторов разрушения p53. Усиление экспрессии MDM2 может привести к инактивации гена TP53 и, следовательно, к снижению его онкосупрессорной функции [5]. Ассоциация полиморфизма rs2279744 гена MDM2 с риском развития различных нозологических форм злокачественных новообразований включая КРР достаточно широко изучена. Результаты мета-анализов свидетельствуют о разнонаправленном эффекте при различных формах рака: снижение риска — рак простаты и пищевода, нейтральное действие — рак желчного пузыря, слабое повышение риска — рак желудка. Проведенные ранее мета-анализы [11, 12] показали, что данный полиморфизм не имеет достоверных ассоциаций с риском развития КРР в европейской популяции и наличие их в азиатской. Исследование, проведенное нами, показало снижение риска развития КРР при гетерозиготном варианте носительства данного полиморфизма.

Таким образом, впервые была изучена ассоциация некоторых однонуклеотидных полиморфизмов генов системы апоптоза с риском развития КРР среди российской популяции. Молекулярно-генетические исследования могут явиться перспективным методом популяционного скрининга многофакторных заболеваний, включая злокачественные новообразования. Однако требуется дальнейшее изучение SNPs с вовлечением большего количества пациентов, принадлежащих к различным этническим и географическим группам, и оценка взаимного влияния средовых (корректируемых) факторов для обоснования экономической и клинической эффективности использования результатов генотипирования в практическом здравоохранении.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гухман В.Б. О планировании репрезентативных выборок данных в социально-гуманитарных исследованиях. Вестник Тверского государственного технического университета. 2013, 2: 12-17.
2. Имянитов Е.Н. Молекулярные механизмы опухолевого роста. Вопросы онкологии. 2010, 2: 117-128.
3. Петрова Г.В., Старинский В.В., Грецова О.П., Простов М.Ю. Показатели онкологической помощи больным колоректальным раком. Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. 2013, 6: 41-43.
4. Степанов В.А. Геномы, популяции, болезни: этническая геномика и персонализированная медицина. Acta Naturae. 2010, 4: 18-31.
5. Чумаков П.М. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме. Успехи биологической химии. 2007, 47: 3-52.
6. Dahabreh I.J., Linardou H., Bouzika P. et al. TP53 Arg72Pro polymorphism and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2010, 19 (7): 1840-1847.
7. Li X., Dumont P., Della Pietra A. et al. The codon 47 polymorphism in p53 is functionally significant. J. Biol. Chem. 2005, 280 (25): 24245-24251.
8. Ma X., Zhang B., Zheng W. Genetic variants associated with colorectal-cancer risk: comprehensive research synopsis, meta-analysis, and epidemiological evidence. Gut. 2014, 63: 326-336.
9. Migliorini G., Fiege B., Hosking F.J. et al. Variation at 10p12.2 and 10p14 influences risk of



- childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia and phenotype. *Blood*. 2013, 122 (19): 3298-3307.
10. Polakova V., Pardini B., Naccarati A. et al. Genotype and haplotype analysis of cell cycle genes in sporadic colorectal cancer in the Czech Republic. *Hum. Mutat.* 2009, 30 (4): 661-668.
11. Qin X., Peng Q., Tang W. et al. An updated meta-analysis on the association of MDM2 SNP309 polymorphism with colorectal cancer risk. *PLoS One*. 2013, 8 (9): e76031.
12. Sameer A.S., Shah Z.A., Syeed N. et al. TP53 Pro47Ser and Arg72Pro polymorphisms and colorectal cancer predisposition in an ethnic Kashmiri population. *Genet. Mol. Res.* 2010, 9 (2): 651-660.
13. Theodoratou E., Montazeri Z., Hawken S. et al. Systematic meta-analyses and field synopsis of genetic association studies in colorectal cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2012, 104 (19): 1433-1457.
14. Wang J.J., Zheng Y., Sun L. et al. TP53 codon 72 polymorphism and colorectal cancer susceptibility: a meta-analysis. *Mol. Biol. Rep.* 2011, 38 (8): 4847-4853.

*Поступила 25.04.16*

Контактная информация: Альева М.Х.,  
614990, Пермь, ул. Петропавловская, 26, р.т. (324)217-10-31

## ОБЗОРЫ

© Ю.В.ЗАХАРОВА

*Ю.В.Захарова*

### ФАКТОРЫ АДГЕЗИИ БИФИДОБАКТЕРИЙ

Кемеровская государственная медицинская академия

Представлены данные по фимбриальным и афимбриальным факторам адгезии бифидобактерий. Описаны пилеподобные структуры, их строение, условия образования у разных видов бифидобактерий. Роль афимбриальных адгезинов у бифидобактерий выполняют некоторые сахаролитические ферменты. Трансальдолаза и енолаза обнаружены у бифидобактерий на поверхности клеток. Трансальдолаза обеспечивает связывание бифидобактерий с муцином и их аутоагрегацию. Поверхностная енолаза имеет сродство к плазминогену, поэтому бифидобактерии приобретают поверхностно-связанный белок с протеолитической активностью. Описаны молекулярные структуры, придающие бифидобактериям гидрофобность — поверхностный липопротеин Вор А и липотейхоевые кислоты.

*Журн. микробиол., 2016, № 5, С. 80—87*

Ключевые слова: бифидобактерии, пилеподобные структуры, трансальдолаза, енолаза, липопротеин, липотейхоевые кислоты

*Yu.V.Zakharova*

### FACTORS OF ADHESION OF BIFIDOBACTERIA

Kemerovo State Medical Academy, Russia

Data on fimbrial and afimbrial adhesion factors of bifidobacteria are presented. Pili-like structures, their composition and conditions of formation in various species of bifidobacteria are described. Several sugar-lytic enzymes serve as afimbrial adhesins in bifidobacteria. Transaldolase

and enolase are detected in bifidobacteria on cells' surface. Transaldolase ensures binding of bifidobacteria with mucin and their auto-aggregation. Surface enolase has an affinity to plasminogen, thus bifidobacteria obtain a surface-bound protein with proteolytic activity. Molecular structures giving bifidobacteria hydrophobic properties are described — surface lipoprotein Bop A and lipoteichoic acids.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 5, P. 80—87

Key words: bifidobacteria, pili-like structures, transaldolase, enolase, lipoprotein, lipoteichoic acids

Пусковым механизмом взаимодействия между макро- и микроорганизмом является адгезия [1, 2]. Однако в большинстве случаев факторы и механизмы адгезии изучены у патогенных микроорганизмов, например энтеропатогенных *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Yersinia spp.* и различных грамположительных кокков, что обусловлено необходимостью разработки новых подходов в лечении и профилактике инфекций, вызванных этими бактериями [5, 6, 8]. В связи с огромным влиянием микробиоты на здоровье человека и ростом числа патологических состояний, сопровождающихся развитием микрoэкологических нарушений, в настоящее время активно изучаются факторы адгезии и у резидентной микрофлоры [2 — 4]. Контактные взаимодействия со структурами макроорганизма как у представителей нормальной микрофлоры, так и у патогенных микроорганизмов схожи. Выделяют две группы механизмов прикрепления бактерий к клеткам или субстратам — неспецифические и специфические. Неспецифическая адгезия обратима и связана с физико-химическими особенностями бактериальных клеток — общим зарядом поверхности, гидрофобностью, наличием ионных связей с ионогенными группами [7, 15, 20, 27]. Специфическая адгезия необратима и осуществляется у микроорганизмов с участием молекул-адгезинов (лигандов), которые обладают высоким сродством к рецепторам кожи и слизистым человека [4, 30]. Успехи в изучении у бифидобактерий структур и молекул, участвующих в адгезии, достигнуты после секвенирования генома пробиотических штаммов, что связано с необходимостью совершенствования их функциональных характеристик, в том числе и адгезивных свойств [16, 31]. После обнаружения у разных видов бифидобактерий генов, кодирующих поверхностные белки, имеющих сродство к углеводам и производным гликоконъюгатам, факторы адгезии у них стали активно изучать с помощью физических (электронная и атомно-силовая микроскопия) и физико-химических (ядерно-магнитный резонанс, масс-спектрометрия) методов.

Благодаря атомно-силовой микроскопии на поверхности бифидобактерий выявлено наличие пилеподобных структур [19, 23]. Выросты, напоминающие пили, обнаружены у штаммов *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum subsp. longum*, *B. dentium*, *B. adolescentis* и *B. animalis subsp. lactis*. Установлено, что у *B. bifidum* пилеподобные структуры расположены полярно плотным пучком, а у *B. longum subsp. infantis* они малочисленны или отсутствуют. Ворсинки бифидобактерий организованы как у большинства грамположительных бактерий. В отличие от пилей грамотрицательных микроорганизмов, чьи субъединицы связаны посредством нековалентных взаимодействий, большинство ворсинок, обнаруженных у грамположительных бактерий, в том числе и у бифидобакте-

рий, характеризуются ковалентной полимеризацией субъединиц пилина, организованной транспептидазным ферментом под названием сортаза [32]. Размеры пилеподобных структур у разных видов бифидобактерий отличаются, длина нитей колеблется в диапазоне от 100 нм до нескольких микрон, ширина от 10 до 30 нм и высота от 0,5 до 2 нм [19].

В секвенированных геномах *B. dentium*, *B. longum* subsp. *longum*, *B. bifidum*, *B. adolescentis* и *B. animalis* subsp. *lactis* обнаружены гены, кодирующие субъединицы пилина и сортазы. Однако эти гены отсутствовали в геноме *B. longum* subsp. *infantis* [19, 32]. Наибольшее количество генов, кодирующих пили, идентифицировано в геноме *B. dentium*, благодаря чему этот микроорганизм обладает широкими возможностями для адаптации к разным экологическим нишам. Типичный кластер генов у бифидобактерий включает гены, кодирующие основные субъединицы пилина, и один или два гена, несущих информацию о дополнительных минорных субъединицах этого белка. Малые субъединицы пилина по аминокислотной последовательности идентичны минорным субъединицам пилина, выявленным у других грамположительных бактерий, таких как актиномицеты и стрептококки [19]. Все выявленные кластеры генов, кодирующие пилеподобные структуры у бифидобактерий, фланкированы транспозонами, что является показателем их приобретения за счет переноса генетического материала по горизонтали путем конъюгации [19].

Образование пилеподобных структур у бифидобактерий зависит от состава субстрата культивирования и видовой принадлежности микроорганизма. Так, при культивировании *B. bifidum* в питательной среде MRS с фруктоолигосахаридами (ФОС) наблюдается образование большого количества пилеподобных структур, тогда как у *B. dentium* процесс пилеобразования идет слабо. Стимулирующее влияние на экспрессию генов, кодирующих пили у *B. dentium*, имеет лактоза. Наблюдаемое различие фенотипов у *B. bifidum* и *B. dentium* может быть связано с отличием экологических ниш, которые занимают эти микроорганизмы — кишечник и ротовая полость, соответственно. У *B. adolescentis* отмечено увеличение транскрипции генов, кодирующих пилин/сортазу в присутствии коровьего молока, ФОС и N-ацетилглюкозамина. Таким образом, индукция транскрипции генных кластеров у бифидофлоры связана с воздействием различных гликанов, что может быть следствием приспособления бифидобактерий к различным экологическим нишам, отличающимся составом сахаров [19, 23].

Кроме фимбриальных адгезинов у бифидобактерий присутствуют и афимбриальные факторы адгезии. В качестве таких адгезинов выступают поверхностно-связанные белки с ферментативной активностью, опосредующие колонизацию кишечника человека через деградацию внеклеточного матрикса [28, 35]. Анализ протеинов *B. bifidum* с помощью масс-спектрометрии позволил идентифицировать в качестве адгезина к муцину фермент трансальдолазу [22]. Это фермент участвует в пентозофосфатном пути и отвечает за конверсию фруктозо-6-фосфата и эритрозо-4-фосфата в седогептулозу-7-фосфат и глицеральдегид-3-фосфат, позднее включающийся в гликолиз. Хотя фермент расположен на цитоплазматической мембране, у нескольких видов бифидобактерий он обнаружен во внеклеточном пространстве. У *B. longum* из внеклеточного протеома выделены 14 белков, в том числе и трансальдолаза. Кроме того, этот фермент в окружающую среду секреторируют и пробиоти-

ческие штаммы *B. animalis* subsp. *lactis* [22]. Визуализация трансальдолазы на поверхности бактериальной клетки проведена при обработке поверхности *B. bifidum* мечеными антителами. Действительно, недавние исследования показали связь многих ферментов катаболизма углеводов у прокариотических и эукариотических клеток с клеточной стенкой и их способность выполнять функции «по совместительству» [35].

Роль трансальдолазы *B. bifidum* как белка, связывающегося с муцином, была изучена путем выделения гена трансальдолазы у бифидобактерий с последующим внедрением его в геном *Lactobacillus lactis* NZ9000. Рекомбинантный штамм *L. lactis* NZ9000, экспрессирующий трансальдолазу, характеризовался в три раза более высокой адгезией к муцину, чем контрольный штамм без этого гена. Кроме того, установлена связь между адгезией к муцину и аутоагрегацией бифидофлоры [22]. При обработке бифидобактерий протеиназой клетки утрачивали способность к аутоагрегации и восстанавливали этот фенотип при добавлении экстракта белка бактерий или чистой трансальдолазы [9]. Аутоагрегация играет важную роль в выживаемости бактерий при транзите по желудочно-кишечному тракту, обеспечивая возможность колонизации, как минимум, тонкого кишечника [23]. Агрегативный фенотип пробиотических бактерий может также обеспечивать их коагрегацию с патогенными микроорганизмами, тем самым, способствуя выведению возбудителя из разных отделов желудочно-кишечного тракта и уменьшению его вирулентности [23, 29]. Интересен тот факт, что продукция трансальдолазы у *B. longum* сильно снижается при кислой pH, облегчая тем самым прохождение бактерий через желудок, предотвращая преждевременную адгезию в верхних отделах пищеварительного тракта [22]. Таким образом, трансальдолаза у бифидобактерий выполняет несколько функций «по совместительству»: участвует в пентозофосфатном пути расщепления углеводов, является фактором агрегации и специфическим адгезином, связывающимся с муцином слизистой оболочки.

Еще одним сахаролитическим ферментом, участвующим в адгезии у бифидобактерий, является енолаза [14, 34]. Енолаза обеспечивает формирование фосфоенолпирувата из 2-фосфоглицерата. Этот белок имеет сродство к человеческому плазминогену. Взаимодействие с системой плазминогена/плазмина хозяина представляет собой новый компонент в молекулярных перекрестных взаимодействиях между бифидобактериями и организмом человека. Плазминоген является проферментом плазмина, трипсиноподобной сериновой протеазой с широкой субстратной специфичностью. Он синтезируется в основном гепатоцитами, однако выявлены и другие источники плазминогена, в том числе кишечник [36]. В активной форме плазмин участвует в фибринолизе и деградации экстрацеллюлярного матрикса и базальной мембраны. Возможность вмешаться в плазминоген/плазмин систему является стратегией для колонизации хозяина у некоторых патогенных микроорганизмов и комменсалов человеческого желудочно-кишечного тракта [11, 18]. С прикреплением плазминогена на поверхности бактериальной клетки и его последующим преобразованием в плазмин микроорганизм приобретает поверхностно-связанный белок с протеолитической активностью. Это облегчает миграцию бактерий между физическими и молекулярными барьерами макроорганизма и позволяет удовлетворять питательные потребности микробов в ходе коло-

низационного процесса [18]. У разных видов бактерий описаны несколько рецепторов для человеческого плазминогена. Кроме связывания с плазминогеном большинство из этих структур выполняют и другие важные функции: обеспечивают движение, ферментативную деятельность, поглощение питательных веществ [11]. Недавно продемонстрирована дозозависимая активность енолазы как плазминоген-связывающего рецептора у четырех штаммов бифидобактерий, принадлежащих к видам *B. lactis*, *B. bifidum* и *B. longum* [14]. Иммуноэлектронная микроскопия позволила установить, что енолаза распределяется на поверхности бифидобактерий в виде кластеров, т.е. эпитопы экспонированы не равномерно [14]. Механизмы секреции и поверхностной локализации этого важнейшего гликолитического фермента до сих пор обсуждаются [11, 12]. Выделенная и очищенная енолаза *B. lactis* характеризуется более высоким сродством к плазминогену, по сравнению с эукариотическим ферментом, и меньшим сродством, по сравнению с енолазой патогенных микроорганизмов — *Streptococcus pyogenes*, *S. pneumoniae* и *S. suis* [14]. Дело в том, что у енолазы *B. lactis* присутствует только один сайт связывания с человеческим плазминогеном [11]. Кроме бифидобактерий поверхностные енолазы известны у двух видов комменсалов человека рода *Lactobacillus* [29, 30]. Однако у *L. crispatus* поверхностная енолаза является рецептором для человеческого плазминогена, а у *L. plantarum* енолаза является фибронектин-связывающим белком [30]. В частности, в отношении бифидобактерий вопросы способности енолазы взаимодействовать с белками внеклеточного матрикса — ламинином и фибронектином — еще не изучены.

Относительно недавно у пробиотического штамма *B. bifidum* MIMBb75 описан поверхностный липопротеин Вор А [21, 24]. Первоначально его рассматривали как видоспецифичный адгезин, который обуславливал *in vitro* высокую адгезивную способность *B. bifidum* на эпителиальных линиях клеток Сасо-2, НТ-29 и Т-84. Об этом свидетельствовало то, что при обработке бифидобактерий проназой К в концентрации 1 мг/мл значительно снижалась их способность адгезироваться на всех линиях клеток [21]. Ген, кодирующий липопротеин Вор А, обнаружен у 15 штаммов *B. bifidum*, он выделен и успешно экспрессирован с помощью *E. coli*. Предполагалось использовать ген для создания рекомбинантных пробиотических штаммов бифидобактерий, обладающих высокими адгезивными свойствами. Однако в настоящее время, благодаря использованию антисыворотки против Вор А и рекомбинантных Вор А, извлеченных из мембраны, без липидного радикала, для предупреждения возможных неспецифических эффектов, обусловленных гидрофобной природой N-концевой части белка, роль поверхностного липопротеина у *B. bifidum* пересмотрена [25]. При обработке *B. bifidum* антисывороткой снижение способности бактерий адгезироваться на эпителиальных клетках *in vitro* не отмечено. Данный эксперимент подтверждает, что Вор А не является адгезином, иначе бы адгезия, наоборот, снижалась или полностью блокировалась. Помимо ингибирующего проведен конкурентный эксперимент, который заключался в обработке эпителиальных клеток Сасо-2 рекомбинантным Вор А с гидрофобным липидным концом, что блокировало адгезию *B. bifidum* на эпителии [25]. Известно, что высокая гидрофобность клеточной поверхности

пробиотических штаммов коррелирует со способностью подавлять адгезию патогенных бактерий через создание стерических помех [15, 17, 20, 33]. Другими словами, гидрофобные молекулы эффективно связываются с эпителиальными клетками и, тем самым, блокируют бактериальные сайты связывания, создавая помехи. Аналогичным образом идет конкурентное ингибирование адгезии бифидобактерий на эпителиальных клетках, вызванное липид- или пептидосодержащим гидрофобным Вор А, который является помехой для адгезии после неспецифического гидрофобного взаимодействия Вор А белка с клеточной поверхностью Сасо-2 [25]. Также установлено, что рекомбинантный липопротеин Вор А обуславливает умеренную адгезию бифидобактерий к кишечной слизи и не влияет на связывание микроорганизмов с фибронектином [25]. Таким образом, липопротеин Вор А у *V. bifidum* играет опосредованную роль в адгезивном процессе, влияя на гидрофобность клеточной поверхности.

Еще одним полимером, участвующим в адгезии бифидобактерий на эпителиальных клетках, являются липотейхоевые кислоты (ЛТК) [13]. Они обнаружены у многих грамположительных бактерий и состоят из 1,3-связанных цепей полиглицеролфосфата и гликолипидных фрагментов. ЛТК закреплены в клеточной стенке через их липидные остатки [26]. У бифидобактерий ЛТК имеют уникальное строение. Структурный анализ кислот, выделенных из пяти штаммов бифидобактерий, показал расположение анионных глицерофосфатных цепочек в виде боковых радикалов на галактофуранановых цепях. При этом в типичных липотейхоевых кислотах те же единицы образуют гидрофильные полимерные цепи. У *V. bifidum*, *V. breve* и *V. longum* имеются два типа ЛТК, которые отличаются по содержанию жирных кислот. Иногда дополнительные остатки жирных кислот могут быть присоединены к углеводному остатку липидного якоря, такому как галактопираноза [13]. У бифидобактерий отмечается большое содержание в составе липидной части молекулы олеиновой и пальмитиновой кислот, доля которых достигает 40%, тогда как у стрептококка, например, их содержание не превышает 24% [13, 26]. Ядерно-магнитный резонанс показал присутствие 1,5-β-связей в галактофуранановой цепи, 1,6-β-связей в гликановой цепи и галактопиранозы в каждой молекуле ЛТК бифидобактерий. У разных штаммов и видов бифидобактерий ЛТК отличаются по длине β-гликановых и β-галактофуранановых цепей, а также числом глицерофосфатных цепочек, т.е. как и у большинства микроорганизмов эти полимеры имеют таксономическое значение [13, 23]. С помощью ЛТК бифидобактерии обратимо связываются с колоноцитами, при этом взаимодействие с эпителиальными клетками происходит посредством липидной части кислот [13]. Липидные остатки молекулы ЛТК бифидобактерий, как и у многих грамположительных микроорганизмов, придают гидрофобность клеточной поверхности в целом, обуславливая неспецифическую обратимую адгезию бифидофлоры [13, 33].

Таким образом, бифидобактерии обладают широким набором факторов адгезии, что позволяет им доминировать в кишечном микросимбиозе и успешно конкурировать в борьбе за сайты связывания на слизистой с патогенными и условно патогенными микроорганизмами. Дальнейшие исследо-

вания факторов адгезии бифидофлоры в норме и при различных патологиях позволят раскрыть патогенетическую основу микрoэкологических нарушений кишечника, а использование биотехнологических подходов, направленных на совершенствование адгезивных свойств пробиотических штаммов — это перспектива в разработке новых современных пробиотических препаратов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бухарин О.В. Инфекция — модельная система ассоциативного симбиоза. Журн. микробиол. 2009, 1: 83-86.
2. Бухарин, О.В., Кремлева Е.А., Черкасов С.В. Особенности эпителиально-бактериальных взаимодействий при бактериальном вагинозе. Журн. микробиол. 2012, 3: 3-8.
3. Бухарин О.В., Сгибнев А.В. Влияние активных форм кислорода на адгезивные характеристики и продукцию биопленок бактериями. Журн. микробиол. 2012, 3: 70-73.
4. Лахтин В.М., Алешкин В.А., Лахтин М.В., Афанасьев С.С., Поспелова В.В., Шендеров Б.А. Лектины, адгезины и лектиноподобные вещества лактобацилл и бифидобактерий. Вестник РАМН. 2006, 1: 28-34.
5. Маянский А.Н., Чеботарь И.В. Стафилококковые биопленки: структура, регуляция, отторжение. Журн. микробиол. 2011, 1: 101-108.
6. Пронина Е.А., Швиденко И.Г., Шуб Г.М., Шаповал О.Г. Влияние электромагнитного излучения на частотах молекулярного спектра поглощения и излучения кислорода и оксида азота на адгезию и образование биопленок *Pseudomonas aeruginosa*. Журн. микробиол. 2011, 6: 61-64.
7. Рубцова Е.В., Криворучко А.В., Яруллина Д.Р., Богачев М.И., Ким А.С., Куюкина М.С., Ившина И.Б. Влияние физико-химических свойств актинобактерий рода *Rhodococcus* на их адгезию к полистиролу и н-гексадекану. Фундаментальные исследования. 2013, 4: 900-904.
8. Харсеева Г.Г., Москаленко Е.П., Алутина Э.Л., Бревдо А.М. Влияние полиоксидония на адгезивные свойства *Corynebacterium diphtheriae*. Журн. микробиол. 2009, 2: 11-15.
9. Alp G., Aslim B., Suludere Z. et al. The role of hemagglutination and effect of exopolysaccharide production on bifidobacteria adhesion to Caco-2 cells in vitro. Microbiol. Immunol. 2010, 54 (11): 658-665.
10. Andriantsoanirina V., Teolis AC., Xin LX. et al. Bifidobacterium longum and Bifidobacterium breve isolates from preterm and full term neonates: comparison of cell surface properties. Anaerobe. 2014, 28: 212-215.
11. Bergmann S., Wild D., Diekmann O. et al. Identification of a novel plasmin(ogen)-binding motif in surface displayed alpha-enolase of *Streptococcus pneumoniae*. Mol. Microbiology. 2003, 49: 411-423.
12. Boel G., Pichereau V., Mijakovic I. et al. Is 2-phosphoglycerate-dependent automodification of bacterial enolases implicated in their export? J. Mol. Biol. 2004, 337: 485-496.
13. Camp H.J.M., Oosterhof A., Veerkamp J.H. Interaction of bifidobacterial lipoteichoic acid with human intestinal epithelial cells. Infect. Immunity. 1985, (1): 332-334.
14. Candela M., Biagi E., Centanni M. et al. Bifidobacterial enolase, a cell surface receptor for human plasminogen involved in the interaction with the host. Microbiology. 2009, 155: 3294-3303.
15. Canzi E., Guglielmetti S., Mora D. et al. Conditions affecting cell surface properties of human intestinal bifidobacteria. Antonie Van Leeuwenhoek. 2005, 88: 207-219.
16. Duranti S., Milanti S., Lugli GA. et al. Insights from genomes of representatives of the human gut commensal *Bifidobacterium bifidum*. Environ. Microbiol. 2015, 17 (7): 2515-2531.
17. Iguchi A., Umekawa N., Maegawa T. et al. Polymorphism and distribution of putative cell-surface adhesin-encoding ORFs among human fecal isolates of *Bifidobacterium longum* subsp. longum. Antonie van Leeuwenhoek. 2011, 99: 457-471.
18. Esgleas M., Li Y., Hancock M. A. et al. Isolation and characterization of alphaenolase, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus suis*. Microbiology. 2008, 154: 2668-2679.
19. Foroni E., Serafini F., Amidani D. et al. Genetic analysis and morphological identification of

- pilus-like structures in members of the genus *Bifidobacterium*. *Microb. Cell Factories*. 2011, 10 (1): 16-29.
20. Furuhashi K., Kato Y., Goto K. et al. Diversity of heterotrophic bacteria isolated from biofilm samples and cell surface hydrophobicity. *J. Gen. Appl. Microbiology*. 2009, 55: 69-74.
  21. Gleinser M., Grimm V., Zhurina D. et al. Improved adhesive properties of recombinant bifidobacteria expressing the *Bifidobacterium bifidum*-specific lipoprotein Bop A. *Microb. Cell Factories*. 2012, 11 (80): 1-14.
  22. Gonzalez-Rodriguez I., Sanchez B., Ruiz L. et al. Role of extracellular transaldolase from *Bifidobacterium bifidum* in mucin adhesion and aggregation. *Appl. Environ. Microbiology*. 2012, 78 (11): 3992-3998.
  23. Gonzalez-Rodriguez I., Ruiz L., Gueimonde M. et al. Factors involved in the colonization and survival of bifidobacteria in the gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol. Lett.* 2013, 340 (1): 1-10.
  24. Guglielmetti S., Tamagnini I., Mora D. et al. Implication of an outer surface lipoprotein in adhesion of *Bifidobacterium bifidum* to Caco-2 cells. *Appl. Environ. Microbiology*. 2008, 74 (15): 4695-4702.
  25. Kainulainen V., Reunanen J., Hiippala K. et al. BopA does not have a major role in the adhesion of *Bifidobacterium bifidum* to intestinal epithelial cells, extracellular matrix proteins, and mucus. *Appl. Environ. Microbiology*. 2013, 79 (22): 6989-6997.
  26. Percy M.G., Grundling A. Lipoteichoic acid synthesis and function in gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 2014, 68: 81-100.
  27. Raut J., Rathod V., Karuppaiyil S.M. Cell surface hydrophobicity and adhesion: a study on fifty clinical isolates of *Candida albicans*. *Jap. J. Med. Mycology*. 2010, 51: 131-136.
  28. Ruas-Madiedo P., Gueimonde M., Fernández-García M. et al. Mucin degradation by *Bifidobacterium* strains isolated from the human intestinal microbiota. *Appl. Environ. Microbiology*. 2008, 74: 1936-1940.
  29. Satoh E. Adhesion of *Lactobacillus reuteri* to the human epithelial cells brought on by an adhesion factor and receptor-like molecules. *Jap. J. Lactic Acid Bacteria*. 2008, 19 (1): 30-36.
  30. Sun Z., Kong J., Hu Sh. et al. Characterization of a S-layer protein from *Lactobacillus crispatus* K313 and the domains responsible for binding to cell wall and adherence to collagen. *Appl. Microbiol. Biotechnology*. 2013, 97 (5): 1941-1952.
  31. Turrioni F., Foroni E., Montanini B. et al. Global genome transcription profiling of *Bifidobacterium bifidum* PRL 2010 under in vitro conditions and identification of reference genes for quantitative real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiology*. 2011, 77 (24): 8578-8587.
  32. Turrioni F., Serafini F., Mangifesta M. et al. Expression of sortase-dependent pili of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 in response to environmental gut conditions. *FEMS Microbiol Lett.* 2014, 357 (1): 23-33.
  33. Wang L-Q., Meng X-Ch, Zhang B-R. Influence of cell surface properties on adhesion ability of bifidobacteria. *World J. Microbiol. Biotechnology*. 2010, 26: 1999-2007.
  34. Wei X., Yan X., Chen X. et al. Proteomic analysis of the interaction of *Bifidobacterium longum* NCC2705 with the intestine cells Caco-2 and identification of plasminogen receptors. *J. Proteomics*. 2014, 108: 89-98.
  35. Yamamoto K. Various glycosidases of *Bifidobacteria* and their roles in adhesion to intestinal tract. *Jap. J. Lactic Acid Bacteria*. 2008, 19 (1): 2-8.
  36. Zhang L., Seiffert D., Fowler B.J. et al. Plasminogen has a broad extrahepatic distribution. *Thromb Haemost.* 2002, 87: 493-501.

*Поступила 23.03.16*

Контактная информация: Захарова Юлия Викторовна, к.м.н.  
650056, Кемерово, ул. Ворошилова, 22 А, р.т. (3842)73-28-71



*М.П.Костин<sup>1</sup>, А.Д.Шмитко<sup>1</sup>, И.Л.Соловьева<sup>2</sup>,  
А.А.Сависко<sup>3</sup>, В.Б.Полищук<sup>1</sup>, А.А.Рыжов<sup>1</sup>, А.П.Черданцев<sup>2</sup>*

## **НЕОБХОДИМА ЛИ ТРЕТЬЯ ДОЗА ВАКЦИНЫ ПРОТИВ КОРИ — ВЗГЛЯД ИММУНОЛОГА**

<sup>1</sup>НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, <sup>2</sup>Ульяновский государственный университет, <sup>3</sup>Ростовский государственный медицинский университет

Представлены иммунологические аспекты особенностей формирования поствакцинального иммунного ответа к вирусу кори и выявлены причинно-следственные связи, приводящие к исчезновению протективных антител к вирусу кори, как один из доводов к усовершенствованию тактики вакцинации с целью увеличения иммунной прослойки населения и улучшения эпидемиологической ситуации по кори в целом. На современном этапе при массовой вакцинации против кори установлена доля серонегативных среди женщин репродуктивного возраста и новорожденных (до 20,1%) с дополнительным увеличением этого показателя на 8 — 13% при патологическом течении беременности женщин. В возрасте 12 мес. доля серонегативных среди детей с отклонением в состоянии здоровья достигает 80 — 90,0% против 53,8% у здоровых. Показано, что ревакцинация детей с отклонением в состоянии здоровья не приводит к продукции антител к вирусу кори в защитном титре в 30,4 — 33,3% случаев, что может способствовать формированию групп риска по инфицированию вирусом кори при неблагоприятной эпидемической ситуации. Обсуждается вопрос о возможном введении третьей дозы вакцины против кори среди указанных групп населения.

Журн. микробиол., 2016, № 5, С. 88—94

Ключевые слова: корь, поствакцинальный иммунитет, серонегативные, трансплацентарные антитела, беременные, новорожденные, вакцинация часто болеющих детей, вакцинация при аллергопатологии

*M.P.Kostinov<sup>1</sup>, A.D.Shmitko<sup>1</sup>, I.L.Solovieva<sup>2</sup>,  
A.A.Savisko<sup>3</sup>, V.B.Polischuk<sup>1</sup>, A.A.Ryzhov<sup>1</sup>, A.P.Cherdantsev<sup>2</sup>*

## **IS A THIRD DOSE OF MEASLES VACCINE NECESSARY — AN IMMUNOLOGIST'S VIEW**

<sup>1</sup>Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, <sup>2</sup>Ulyanovsk State University, <sup>3</sup>Rostov Medical University, Russia

Immunological aspects of features of post-vaccine immune response to measles virus are presented and causal relationships are detected, that lead to the disappearance of protective antibodies against measles virus, as one of the arguments for improvement of vaccination tactics with the aim to increase immune population and enhancement of epidemiologic situation regarding measles in general. At contemporary stage during mass vaccinations against measles a portion of seronegatives among women of reproductive age and newborns (up to 20.1%) with an additional increase of this parameter by 8 — 13% during pathologic course of pregnancy is established. At the age of 12 months portion of seronegatives among children with health deviations reaches 80 — 90.0% against 53.8% — in healthy. Revaccination of children with deviation of health is shown not to result in production of antibodies against measles virus at protective titers in 30.4 — 33.3% of cases, that could facilitate formation of risk groups for measles virus infection during unfavorable epidemic situations. A problem of possible introduction of a third dose of the measles vaccine among the indicated population groups is discussed.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 5, P. 88—94

Key words: measles, post-vaccine immunity, seronegatives, transplacental antibodies, pregnant, newborns, vaccination of frequently ill children, vaccination during allegro-pathology

Несмотря на успехи в ликвидации коревой инфекции, достигнутые с помощью активной вакцинопрофилактики, с 2010 г. отмечается неуклонный рост заболеваемости корью в мире. По данным ВОЗ, в мире в 2014 г. от кори умерли 114 900 человек, большинство из которых дети в возрасте до 5 лет [4]. В Европейском регионе в 2014 г. было зарегистрировано 3616 случаев коревой инфекции [14], в 2015 г. данный показатель составил 3969 [15].

Заболеваемость корью в Российской Федерации в 2014 г. составила 3,28 на 100 тыс. населения, 4690 случаев соответственно [2]. В 2015 году по сравнению с 2014 годом отмечалось снижение заболеваемости корью в 5,7 раза. Всего было зарегистрировано 840 случаев заболевания, показатель заболеваемости составил 0,58 на 100 тыс. населения [3].

Тенденция последних лет — увеличение количества заболевших корью среди взрослого населения. Так, среди заболевших корью в России в 2012 г. дети составляли 53,2%, подростки — 3,3%, взрослые — 43,5%; в 2013 г.: дети — 40,6%, подростки — 4,2%, взрослые — 55,5%, в 2014 г.: дети — 43%, подростки — 4%, взрослые — 53% [Цвиркун О.В. и др., 2015].

Рост случаев заболевания корью был обусловлен в основном за счет непривитого контингента населения. В России в 2014 г. 75,1% заболевших не были вакцинированы против кори, однако 24,9% пациентов ранее получали противокоревую вакцину [Цвиркун О.В. и др., 2015]. Существует множество причин, приводящих к инфицированию корью привитых лиц. Одной из ведущих является особенность клинического статуса пациента, подлежащего вакцинации.

Так, по данным исследования, проведенного Соловьевой И.Л. [9], через год после первой вакцинации (в возрасте 12 мес.) отечественной дивакциной корь-эпидемический паротит среди здоровых детей не удалось выявить серонегативных к вирусу кори, тогда как у часто болеющих и детей с аллергическими заболеваниями антитела в защитных значениях ( $\geq 0,18$  МЕ/мл) не выявляли в 1,2 и 9,3% случаев соответственно. К тому же, через год после вакцинации у детей с аллергическими заболеваниями чаще обнаруживали антитела в низкой ( $\geq 0,18$  и  $< 1,0$  МЕ/мл) концентрации в 33,5% случаев против 15 и 14,2% у здоровых и часто болеющих детей соответственно. Необходимо отметить, что доли серонегативных к вирусу кори среди наблюдаемых групп перед ревакцинацией увеличивались и существенно не отличались между собой, составляя 28,6; 32,5 и 30% у здоровых, часто болеющих и детей с аллергическими заболеваниями соответственно. Спустя год после ревакцинации отечественной дивакциной против кори и эпидемического паротита указанных групп детей доля серонегативных среди часто болеющих составляла 30,4 и 33,3% — среди детей с аллергическими заболеваниями, в то время как здоровые дети были серопозитивными к вирусу кори в 100% случаев. Уровень антител в низких значениях через год после введения ревакцинирующей дозы среди здоровых составлял 28,6%, часто болеющих — 21,7% и детей с аллергическими заболеваниями — 31,3%. Вероятно, через 10 — 15 лет после ревакцинации, то есть в подростковом и взрослом возрасте, от 21 до 32% лиц могут оказаться восприимчивыми к коревой инфекции [9]. Анализ заболеваемости корью в зависимости от прививочного анамнеза в 2014 г. в России показал, что доля вакцинированных лиц среди заболевших составила от 13,8% (Московская обл.) до 24,9% (РФ), в Республике Казахстан в 2014 г. этот показатель был еще выше и составил 34% [7, 10].

Данное предположение было подтверждено результатами другого исследования по оценке уровня IgG к вирусу кори в пуповинной крови детей, рожденных от матерей различных возрастных групп [5]. Исследование 672 сывороток пуповинной крови выявило, что в 20,1% случаев новорожденные были серонегативными к вирусу кори. Проведенный анализ концентрации противокоревых IgG в пуповинной крови младенцев в зависимости от возраста их матерей выявил, что большее количество серонегативных результатов регистрировалось у детей, рожденных женщинами в возрасте 26 — 30 лет (25%) и 31 — 35 лет (25%); меньшее — у младенцев от матерей в возрасте 16 — 20 лет (10,3%) и 36 — 43 года (11,8%). У новорожденных от матерей 21 — 25 лет доля серонегативных составляла 19,2%.

Изучение концентрации IgG к вирусу кори в пуповинной крови новорожденных выявило его снижение с увеличением возраста матерей, составляя в группе 16 — 20 лет 0,7 [0,3; 1,9] МЕ/мл; 21 — 25 лет — 0,48 [0,2; 1,75] МЕ/мл и 26 — 30 лет — 0,45 [0,18; 0,9] МЕ/мл. У новорожденных от матерей 36 — 43 лет уровень IgG к вирусу кори вновь возрастал и составлял 0,98 [0,3; 3,9] МЕ/мл, приближаясь к показателю в группе 16 — 20 лет.

Таким образом, было отмечено увеличение доли серонегативных к вирусу новорожденных с увеличением возраста их матерей до 35 лет включительно как следствие утраты поствакцинального иммунитета. В то же время, выявленная закономерность в увеличении доли серопозитивных к вирусу кори младенцев, рожденных женщинами старшей возрастной группы (после 36 лет), может отражать вероятное инфицирование вирусом кори с атипичным течением заболевания у ранее вакцинированных женщин. При этом, следует отметить, что ни одна из обследованных женщин не подтверждала факт вакцинации против кори или перенесенного заболевания в последние 10 лет.

Следовательно, дети, рожденные женщинами в возрасте 26 — 30 лет наиболее восприимчивы к вирусу кори, так как в 25% случаев являются серонегативными и имеют низкий уровень (0,45 [0,18; 0,9] МЕ/мл) защитных IgG к возбудителю данного заболевания. В случае возникновения вспышки заболевания указанная когорта детей может быть инфицирована вирусом кори. Так, доля пациентов первого года жизни, заболевших корью в 2014 г. в Московской обл., составила 29%, при этом среди них были больные в возрасте 3 — 4 мес. [10]. Однако нельзя исключить возможность инфицирования коревой инфекцией не только данной группы детей, но и их матерей во время беременности. Основная опасность кори во время беременности заключается в более тяжелом ее течении [13, 17, 18]. У беременных существует высокий риск присоединения пневмонии и возникновения тяжелого респираторного дистресс-синдрома, который может привести к смерти женщины. Хотя вирус кори не обладает тератогенным действием и не приводит к врожденным аномалиям развития ребенка, он может вызывать гистологические повреждения плаценты, приводящие к внутриутробной гибели плода, в результате чего данная беременность с большой долей вероятности может закончиться самопроизвольным выкидышем или преждевременными родами. Если заболевание присоединяется в конце беременности, есть возможность внутриутробного инфицирования плода с развитием врожденной кори, протекающей с тяжелыми последствиями для новорожденного, высоким риском развития подострого склерозирую-

шего панэнцефалита, приводящего к смерти или инвалидизации ребенка [13, 17, 18].

Одним из важных критериев эффективности вакцинации является оценка иммуногенности вакцинного препарата. Проведенное сравнительное исследование при использовании двух вакцинных препаратов у здоровых, часто болеющих и детей с аллергическими заболеваниями показало, что введение отечественной дивакцины корь-эпидемический паротит сопровождается продукцией антител к вирусу кори в аналогичных значениях, как и после введения ассоциированной вакцины против кори, эпидемического паротита и краснухи (Приорикс), с одинаковым их сохранением спустя год после вакцинации.

В России, как и во многих странах мира, первая вакцинация против кори проводится в возрасте 12 мес., поскольку считается, что до этого возраста ребенок может быть защищен антителами, переданными от матери во время беременности. Однако существует много факторов, влияющих на трансплацентарную передачу антител от матери плоду и их сохранение в течение первого года жизни [12]. Общеизвестны такие, как материнский уровень общего и специфических IgG, гестационный возраст новорожденного, подклассы IgG, природа антигена, патологии плаценты [19]. При этом важнейшим фактором является наличие у женщины заболеваний, осложняющих течение беременности. Так, показано, что плацентарная недостаточность и внутриутробная инфекция приводят к нарушению трансплацентарной передачи антител от матери плоду и увеличению количества серонегативных к вирусу кори новорожденных от 27,9 до 32,6%, что не отмечено у доношенных детей, рожденных матерями с физиологическим течением беременности (10,9% серонегативных к вирусу кори). Также у данных групп детей отмечено снижение концентрации IgG к вирусу кори (0,5 [0,15; 1,4] и 0,3 [0,17; 0,8] МЕ/мл) по сравнению с группой младенцев от матерей с неосложненным течением беременности (0,7 [0,3; 1,9] МЕ/мл).

То есть, патология, возникающая во время беременности, может увеличивать риск рождения серонегативного к вирусу кори ребенка на 8 — 13% к обычно регистрируемой доли серонегативных в Москве, Московской обл. — 20,1% [1]. Исследования, проведенные в США, показали, что до 19% женщин детородного возраста, родившихся после начала эры вакцинации против кори, в период между 1967 и 1976 годами, оказались серонегативными к вирусу, а следовательно, дети, рожденных такими матерями, будут лишены антител с самого рождения [20]. Учитывая тот факт, что за первые 6 мес. жизни ребенка уровень антител у него снижается на 70% от исходного, можно ожидать, что во вторые полгода жизни большинство из них окажутся серонегативными [16]. В исследовании, проведенном в период с 2002 по 2006 гг., в котором не изучался акушерско-гинекологический анамнез матери, а учитывалась соматическая патология у детей от рождения до года, было показано, что доля серонегативных к вирусу кори детей перед первой вакцинацией (в возрасте 12 мес.) в среднем составляла 74,6% [9]. При этом, доля серонегативных среди здоровых детей была 53,8%, часто болеющих — 80% и у детей с аллергическими заболеваниями — 90%. Можно предположить, что респираторные инфекции, также как аллергически измененная реактивность организма, приводят к более быстрой утрате материнских антител, по сравнению со здоровыми. С одной

стороны, положительным моментом является то, что данные группы детей способны отвечать на первое введение вакцины синтезом антител в больших концентрациях, чем дети, у которых на момент вакцинации еще сохранены материнские антитела, которые могут нейтрализовать вакцинный антиген. С другой стороны, отрицательным моментом служит тот факт, что данные дети оказываются уязвимыми к коревой инфекции в возрасте до года, на что указывают и данные литературы. Так, доля детей, заболевших корью на первом году жизни, возросла с 10,0% в 2012 г. до 29,0% в 2014 г. [10].

Разработка и внедрение двукратной вакцинации населения в практику здравоохранения привело к значительному снижению смертности от кори в глобальном масштабе и элиминации инфекции в отдельных регионах мира. По данным ВОЗ с 2010 г. отмечается осложнение эпидемической ситуации по кори в мире, хотя в настоящее время в России отмечается положительная тенденция к ее улучшению. Существует множество факторов, способствующих увеличению заболеваемости корью детей и взрослых. Однако в представленной работе делается акцент на иммунологические аспекты данного вопроса посредством анализа особенностей формирования поствакцинального иммунного ответа и выявления причинно-следственных связей, приводящих к исчезновению протективных антител к вирусу кори, что, в свою очередь, может отражаться на иммунной прослойке населения и эпидемиологической ситуации в целом. До начала эры вакцинации дети считались основным источником коревой инфекции в популяции после исчезновения трансплацентарно переданных материнских антител. Универсальная вакцинация против кори привела не только к значительному снижению заболеваемости и летальности от данной инфекции, но и к передаче материнских антител детям в более низкой концентрации по сравнению с антителами, сформировавшимися вследствие перенесенной болезни [20]. Таким образом, дети, чьи матери родились в эру вакцинации, могут быть восприимчивы к болезни в более раннем возрасте, с одной стороны, а с другой — сохраняется возможность регистрации заболевания среди привитого населения в старших возрастных группах из-за утраты защитных поствакцинальных противокоревых антител. Рост заболеваемости корью среди детей раннего возраста является следствием рождения серонегативных к вирусу кори детей в 20,1% случаев в Москве и Московской обл., в 18,7% случае — в Ростове-на-Дону, что мало отличается от результатов, полученных в США — 19% [5, 11, 20]. Неуклонный рост патологических состояний осложняющих течения беременности женщин сопровождается увеличением когорты новорожденных, серонегативных к вирусу кори, дополнительно на 8 — 13% к регистрируемой доле серонегативных младенцев в Москве, Московской обл. (20,1%) [1, 6, 8]. Хотя первая вакцинация против кори детей сопровождается продукцией защитных антител в 90,7 — 100% случаев, перед ревакцинацией серопозитивными регистрируются от 67,5 до 71,4% вне зависимости от состояния здоровья детей. Через год после ревакцинации среди детей с нарушениями в состоянии здоровья серонегативными являются от 30,4 до 33,3%, следовательно, можно их отнести к группе восприимчивых к вирусу кори. На сегодняшний день не удалось найти данных по изучению иммунной прослойки к вирусу кори среди взрослых, имеющих хронические заболевания, но можно предположить, что через 10 — 15 лет после ревакцинации, проведенной в шестилетнем возрасте, доля серонегативных

может увеличиться как минимум в 2 раза. При возникновении неблагополучной эпидемической ситуации по кори они будут составлять группу риска по инфицированию.

Таким образом, массовая вакцинация населения, патология беременности, рождение иммунокомпрометированных детей, увеличение когорты детей, имеющих различные отклонения в состоянии здоровья, в будущем, вероятно, могут послужить предикторами пересмотра стратегии вакцинации, то есть введения третьей дозы вакцины против кори.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бочарова И.И., Костинов М.П., Новикова С.В., Шмитько А.Д., Обидина А.А., Цивцивадзе Е.Б. Трансплацентарные антитела к вирусу кори у новорожденных при различном течении беременности у их матерей. *Российский вестник акушера-гинеколога*. 2014, 2 (14): 14-18.
2. Инфекционная заболеваемость в Российской Федерации за январь-декабрь 2014 г. (по данным формы №1 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях»). Режим доступа: [http://rospotrebnadzor.ru/activities/statistical-materials/statistic\\_details.php?ELEMENT\\_ID=2938/](http://rospotrebnadzor.ru/activities/statistical-materials/statistic_details.php?ELEMENT_ID=2938/).
3. Инфекционная заболеваемость в Российской Федерации за январь-декабрь 2015 г. (по данным формы №1 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях»). Режим доступа: [http://rospotrebnadzor.ru/activities/statistical-materials/statistic\\_details.php?ELEMENT\\_ID=5525](http://rospotrebnadzor.ru/activities/statistical-materials/statistic_details.php?ELEMENT_ID=5525).
4. Корь: информационный бюллетень. Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs286/ru/>.
5. Костинов М.П., Шмитько А.Д., Бочарова И.И., Черданцев А.П., Сависько А.А., Полищук В.Б. Уровень IgG-антител к вирусу кори в пуповинной крови новорожденных с учетом возраста матерей. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2014, 3: 30-34.
6. Кулаков В.И., Орджоникидзе Н.В., Тютюнник В.Л. Плацентарная недостаточность и инфекция. М., 2004.
7. Омарова А.О., Шайзадина Ф.М., Кошерова Б.Н. Особенности эпидемиологической ситуации по кори на современном этапе. *Журнал инфектологии. Приложение*. 2015, 7 (4): 97.
8. Сидорова И.С., Макаров И.О., Матвиенко Н.А. Внутриутробная инфекция: ведение беременности, родов и послеродового периода. Учеб. пособие. М., МЕДпресс-информ, 2012.
9. Соловьева И.Л., Костинов М.П., Кусельман А.И. Особенности вакцинации детей с измененным преморбидным фоном против гепатита В, кори, эпидемического паротита. Ульяновск, УлГУ, 2006.
10. Феклисова Л.В., Россошанская Н.В., Ливанова И.В. Корь в современных условиях. *Журнал инфектологии. Приложение*. 2015, 7 (4): 109-110.
11. Шмитько А.Д., Костинов М.П., Бочарова И.И., Сависько А.А., Магаршак О.О., Полищук В.Б. Трансплацентарные IgG к вирусу кори в пуповинной крови у новорожденных разных регионов Российской Федерации. *Журн. микробиол.* 2015, 1: 52-57.
12. Шмитько А.Д., Новикова С.В., Бочарова И.И., Якубина А.А., Костинов М.П. Механизмы и факторы, влияющие на трансплацентарную передачу антител класса IgG в системе мать-плацента-плод. *Российский вестник акушера-гинеколога*. 2014, 6 (14): 27-31.
13. Anselem O., Tsatsaris V., Lopez E. et al. Measles and pregnancy. *Press. Med.* 2011, 40 (11): 1001-10074.
14. ECDC. Mode of access: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Measles-rubella-monitoring-first-quarter-2015.pdf>.
15. ECDC. Mode of access: [http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/2016\\_issue\\_1\\_%20Measles%20rubella%20monitoring\\_final.pdf](http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/2016_issue_1_%20Measles%20rubella%20monitoring_final.pdf).
16. Gans H., De Hovitz R., Forghani B. et al. Measles and mumps vaccination as a model to investigate the developing immune system: passive and active immunity during the first year of life. *Vaccine*. 200, 21 (24): 3398-405.

17. Gershon A.A., Klein J.O., Wilson C.B. Chickenpox, measles, and mumps. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. 2011.
18. Guillet M., Vauloup-Fellous C., Cordier A.G. Measles in pregnancy: a review. *Eur. J. Obstetrics Gynecol. Reproduct. Biol.* 2012, 41 (3): 209-218.
19. Palmeira P. IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. Mode of access: <http://www.hindawi.com/journals/jlr/2012/985646/>.
20. Plotkin S.A., Orewstein W.A., Offit P.A. *Vaccines*. Elsevier, 2012.

Поступила 23.03.16

Контактная информация: Костинов Михаил Петрович, д.м.н., проф.,  
105064, Москва, М.Казенный пер., р.т. (495)917-41-49

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*О.В.Дуванова, Б.Н.Мишанькин, Л.В.Романова, С.В.Титова*

## **ХИТИНОЛИТИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС *VIBRIO CHOLERAЕ*: СОСТАВ И РОЛЬ В ПЕРСИСТЕНЦИИ**

Ростовский-на-Дону противочумный институт

В обзоре рассмотрены состав и функции хитинолитического комплекса холерного вибриона, который играет важную роль в сохранении и формировании новых форм вибрионов в окружающей среде, лучше адаптированных для выживания в экологических нишах.

Журн. микробиол., 2016, № 5, С. 94—101

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, хитин, хитиназа, глюкозамин, олигосахариды

*O.V.Duvanova, B.N.Mishankin, L.V.Romanova, S.V.Titova*

## ***VIBRIO CHOLERAЕ* CHITINOLYTIC COMPLEX: THE COMPOSITION AND THE ROLE IN PERSISTANCE**

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

Reviewed the paper are the composition and functions of *Vibrio cholerae* chitinolytic complex which play an important role in the maintaining and creating new forms of vibrios in the environment, it is better adapted to survive in environmental.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 5, P. 94—101

Key words: *Vibrio cholerae*, chitin, chitinase, glucosamine, oligosaccharides

205 лет прошло с тех пор, как в 1811 году Н.Врасопот был открыт хитин. В первой половине XX века к хитину и его производным имели отношение три Нобелевских лауреата: Е. Fischer в 1903 г. синтезировал глюкозамин, Р. Karrer в 1929 г. провел деградацию хитина с помощью хитиназ и W.N. Haworth (1939 г.), который установил абсолютную конфигурацию глюкозамина. Первые работы в России были связаны с модификацией хитина и проведены под руководством П.П. Шорыгина. В 1940 — 1950 гг. биологически активные свойства хитина и его производного хитозана начали изучаться в Советском Союзе учреждениями Министерства обороны в закрытом режиме. Это было связано со способностью хитозана эффективно связывать радиоактивные изотопы и тяжелые металлы, поэтому он изучался прежде всего как эффек-

тивный радиопротектор и детоксикант. Новый всплеск интереса к этим биополимерам произошел в 70-е годы, когда результаты исследований этих соединений начали появляться в открытой печати. Сегодня Россия находится в числе ведущих стран мира не только по запасам хитина, но и по числу и качеству научных исследований, а также оригинальных технологий использования хитина и его производных. Весной 2016 г. свое 16-летие отметило Российское хитиновое общество, объединившее более 50 региональных отделений, что позволило координировать усилия исследователей из разных регионов страны. В настоящее время известно более 70 направлений использования хитина и его производных в различных отраслях промышленности [3, 8]. Эти полимеры обладают рядом важных свойств: высокой биологической активностью [8, 31, 34, 35, 38], совместимостью с тканями человека, животных и растений. Они не загрязняют окружающую среду, поскольку полностью разрушаются ферментами микроорганизмов.

Хитин широко распространенный биополимер в природе и занимает второе место после целлюлозы, являясь нерастворимым в воде полисахаридом, состоящим, в основном, из соединенных  $\beta$ -1,4-гликозидной связью остатков N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозамина (GlcNAc). Практически неисчерпаемым источником хитина является зоопланктон, хитин-содержащие представители которого (амфиподы, копеподы и другие ракообразные) обеспечивают образование в окружающей водной среде более  $10^{11}$  метрических тысяч тонн хитина в год, который в виде «морского снега» опускается в глубины океанов. Однако исследования придонных отложений морей и океанов не выявили скольнибудь значительного количества хитина. Эту загадку разрешили в 1937 г. Zobel C. и Rittenberg S., объяснив ее участием в реминерализации этого природного полимера морских бактерий, включая *Vibrio* spp., наделенных хитинолитической активностью.

Хитин постоянно присутствует и в почве, достигая десятых долей процента. Однако проблема разложения хитина в почве до настоящего времени остается недостаточно понятной и может служить предметом новых исследований по детальному изучению роли хитиназ бактерий в круговороте этого биополимера.

Несмотря на то, что хитин широко распространен в природе, вследствие биодegradации он не накапливается в большинстве экосистем. Множество водных и наземных микроорганизмов продуцирует ферменты — хитиназы (гликозил-гидролазы, КФ 3.2.1.14), ответственные за разложение хитина. Хитиназы встречаются у широкого круга организмов, включая бактерии, грибы, насекомых, растения, животных и человека [1, 4, 5, 7, 9, 33].

Насекомым и ракообразным хитиназы необходимы для частичной деградации старой кутикулы, грибам — для реализации функций аутолиза, питания и морфогенеза [39]; защиты растений от патогенных грибов [39, 42]. Относительно недавно были обнаружены хитиназы у человека. Интересным является тот факт, что хитин не является структурным компонентом тела человека, но в определенных ситуациях в его организме образуется одна из хитиназ, так называемая хитотриозидаза (Chit). Хитотриозидазная активность плазмы крови человека является биохимическим маркером при ряде заболеваний. В последние годы появились работы с презентацией хитиназ и Chitinase-3-Like-1 белка [13, 27, 29] как молекул, наделенных новыми функциями, и на данном этапе выясняется их участие в патогенезе многих инфекций [11, 16, 17, 28, 45, 46].

Два стиля жизни холерного вибриона — водное окружение и кишечник



человека — составляют суть его жизненного цикла (lifestyle), что связано с высокой адаптационной пластичностью возбудителя, эволюционно выгодной для патогена. Интерес к выяснению механизмов, лежащих в основе персистенции, пластичности и реализации истинного биологического потенциала холерных вибрионов, с изучением роли бактериальных ферментов в этих процессах остается неизменным. Показано, что персистенция вибрионов в условиях водного окружения повышается благодаря их способности гидролизовать хитин и колонизировать, в этой связи, разные хитинсодержащие субстраты, включая наружные покровы представителей зоопланктона (копеподы, амфиподы и др.) [19, 25]. Продемонстрировано [12] проявление положительного хемотаксиса микробов к продуктам гидролиза хитина. Хитин можно рассматривать как своеобразную экологическую нишу для холерных вибрионов: так, например, хитин является своеобразным местом (резервуаром) обитания, убежищем от неблагоприятных факторов (низкая температура, низкое значение pH) окружающей среды [10, 32], служит питательным субстратом для вибрионов (источник углерода, азота), на поверхностях хитина вибрионы образуют биопленки [36]. Здесь же возможно подавление пленок других микробов (проявление конкурентных возможностей) [2, 20]. Показана роль хитина и QS (кворум-сенсинг) в регуляции устойчивости биопленок *V. cholerae* к уничтожению их простейшими [41]; рост в биопленках индуцирует гиперинфекционный фенотип у вибрионов [43]; происходит прикрепление и выживание так называемых живых, но некультивируемых форм [44]. Miebom K.L. et al. [30] показали возможность образования у вибрионов, находящихся на поверхности хитина, особых PilA-содержащих пилей IV типа, ChiRP (chitin-regulated pilus), участвующих в прилипанию бактерий к частичкам хитина. Таким образом, хитин может способствовать селекции вибрионов с факторами колонизации хозяина. В условиях водного окружения хитин способен к индукции у вибрионов состояния компетентности к природной генетической трансформации — одному из механизмов внутривидового генетического обмена посредством горизонтальной передачи генов, обеспечивающего конверсию серогрупп, их антигенное разнообразие и возникновение вариантов *V. cholerae*, лучше адаптированных для выживания в экологических нишах или более патогенных для человека [30]. Сам по себе этот процесс довольно сложный и предполагает присутствие комплекса пилей IV типа, ДНК-связывающего белка, цАМФ-цАМФ-связывающего белка, дисахарида (GlcNAc)<sub>2</sub> хитина, в присутствии которого происходит экспрессия TfoR sRNA для эффективной трансляции позитивного регулятора tfoX<sub>c</sub> активности группы генов, участвующих в явлении естественной компетентности возбудителя [26, 48]. Показано [47], что CytR у холерного вибриона является глобальным положительным регулятором большинства генов компетентности, оперонов системы секреции VI типа и хитиназ.

Известна точка зрения L.Reimann и F.Azam [37] о том, что широкое распространение вибрионов в природе связано с их способностью разрушать хитин, а сходство путей деградации хитина в геномах ряда представителей позволило D.E.Hunt [18] утверждать, что метаболизм хитина является древним признаком вибрионов.

В 1984 году Davis B. и Eveleigh D. [15] предположили существование в природе двух путей катаболизма хитина. Один из них хорошо изучен и использу-

ется микроорганизмами для утилизации полимера в качестве источника энергии, углерода и азота. Этот путь включает деградацию хитина под действием хитиназ первоначально до высших хитоолигосахаридов и далее до хитобиозы с последующим превращением ее в N-ацетилглюкозамин в присутствии N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы и далее в глюкозамин при действии N-ацетилглюкозаминдезацетилазы.

Во втором, так называемом хитозановом пути, ключевым ферментом является хитиндезацетилаза (КФ 3.5.1.41), которая отвечает за превращение хитина в хитозан. Образующийся хитозан под действием хитозаназы деградирует до олигомеров глюкозамина, последние, в свою очередь, до мономера в присутствии фермента глюкозаминидазы. И хотя гликозилгидролаза хитозаназа (КФ 3.2.1.132) сравнительно недавно была описана у *Bacillus thuringiensis* [23], наличие и состояние генов хитозанового пути усвоения хитина у холерного вибриона на сегодня остаются неизвестными.

Большее внимание сконцентрировано на хитиновом пути расщепления хитина у холерного вибриона [22], в реализации которого, по данным K. L. Meibom et al. [30], принимают участие 360 по-разному регулируемых генов из 41 регулона. Статистический анализ экспрессии совокупности микропрофилей генов планктонных культур *V. cholerae* в ответ на присутствие в качестве природного субстрата панциря краба и растворимых олигосахаридов хитина (GlcNAc)<sub>n</sub> при n=2–6 позволил идентифицировать три набора генов, регулируемых дифференцированно. Принято считать, что деградация хитина включает четыре основных этапа: узнавание хитина, прикрепление к нему, ферментативная деградация хитина и утилизация углерода и азота из продуктов расщепления [21]. В процессе узнавания хитина может участвовать сенсорная ChiS мембраносвязанная хитин-чувствительная гистидинкиназа (ген VC0622), контролирующая весь хитинолитический каскад у вибрионов [30], а за прикрепление к нему наряду с маннозо-чувствительными пилиями MSHA участвуют хитин-регулируемые пили ChiRP (ген VC2324), спиндолиноподобный хитин-связывающий белок (ген VCA0140) и ген VCA0811, детерминирующий образование N-ацетилглюкозамин-связывающего белка. GlcNAc обеспечивает координированную экспрессию генов, вовлеченных в хемотаксис и адгезию, а также транспорт и ассимиляцию ацетилированного глюкозамина, тогда как (GlcN)<sub>2</sub> обеспечивает индукцию генов, необходимых для транспорта и катаболизма неацетилированных остатков хитина. При этом программа утилизации хитина у холерного вибриона, как установлено с помощью протеомного анализа, носит внеклеточный характер и предполагает транспорт за пределы клетки, по крайней мере, шести белков (три хитиназы, глюкозамин-связывающий белок, деацетилаза олигосахаридов хитина и спиндолин-подобный хитин-связывающий белок) с использованием системы секреции второго типа (Eps — extracellular protein secretion) [40].

Все упомянутые хитин-деградирующие ферменты действуют в природе совместно с другими белками клетки (холерный токсин для холерного вибриона, НАР-протеаза, сиалидаза, сериновые протеазы VesA, VesB, VesC и др.), что является характерной чертой большинства хитинолитических комплексов у бактерий.

Катаболический каскад, согласно схемы Hunt D.E. et al. [18], начинается с расщепления полимера на олигомеры внеклеточными хитиназами (гены

VC0769, VC1952, VCA0027), которые, хотя и обладают разной активностью или регуляцией, действуют согласованно при превращении хитина в попадающие затем в периплазматическое пространство олигосахариды (GlcNAc)<sub>n≥2</sub>. Сюда, видимо, можно отнести N-ацетил-β-D-глюкозаминидазу и N-ацетилгексозаминидазу (VC2217 и VC0613). В периплазме же олигосахариды хитина под действием периплазматических хитодекстриназы (VCA0700) и N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы деградируют до (GlcNAc)<sub>1,2</sub>. Предполагается, что мономер GlcNAc и димер N,N'-диацетилхитобиоза могут проникать в периплазму также с помощью неспецифических поринов. Возможно превращение N-ацетилглюкозамина в глюкозамин при действии N-ацетилглюкозаминдеацетилазы *V.cholerae* (ген VC1280), которая специфически гидролизует предпоследний GlcNAc у нередуцированных концов олигосахаридов хитина [24].

Полная деградация хитина предполагает усвоение его деацетилированных (GlcN) остатков через систему ферментов и последующее превращение во фруктозо-6-фосфат под влиянием АТФ-зависимой глюкозаминкиназы [18].

Обнаруженная у вибрионов мощная хитинолитическая система, включающая не менее 5 хитиназ, позволяет с большей определенностью поддерживать утверждение Lipp E.K. et al. [25] о существовании у пандемичных штаммов *V. cholerae* экологической ниши вне человека, ассоциированной с хитинсодержащими организмами, которые служат для вибрионов не только питательным субстратом, но и местом обитания (резервуаром), своеобразным убежищем от неблагоприятных факторов окружающей среды и одновременно средством инфицирования человека при употреблении загрязненной планктоном воды. В последнем случае весьма впечатляют расчеты Colwell R. [14] о том, что одна копепода может нести на своей поверхности от 10<sup>4</sup> до 10<sup>6</sup> клеток *V. cholerae* и тогда случайное проглатывание нескольких копепод с необеззараженной питьевой водой может привести к заболеванию холерой, которая является дозозависимой (около 10<sup>4</sup> м.к.) инфекцией. Исследования в Бангладеш показали, что семьи, в которых вода из прудов перед употреблением подвергается фильтрации через ткань сари, примерно на 50% уменьшает риск заболевания холерой [25].

Выполненное на коллекции природных штаммов вибрионов O1 и O139 серогрупп ПЦР-исследование состояния генов хитинолитического комплекса показало их стабильность у вибрионов клинического происхождения, которые несли полный набор из 12 проверенных генов хитиназного комплекса [1,7]. Довольно пестрая картина результатов в ПЦР была выявлена у вибрионов водного происхождения: у всех исследованных штаммов *V. cholerae* O139 отсутствовали гены VC1073 (хитиназа), VC1952 (хитиназа ChiA1), VCA0811 (GlcNAc-связывающий белок, glpA), VC0972 (хитопорин) и VC2324 (хитинрегулируемые пили, pilA), а у некоторых *V. cholerae* O1 — ген VC1952, что можно рассматривать как следствие обширных хромосомных перестроек в результате длительного пребывания штаммов в водном окружении [6]. При этом, у них регистрировалась активность хитиназы, видимо, за счет компенсаторной деятельности генов, детерминирующих экспрессию хитиназ VC0769 и VCA0027 (внеклеточная, ChiA2). Небезинтересно отметить стабильный характер наследования генов VC0769 (хитиназа), VCA0027, VCA0140 (хитинсвязывающий белок) и VC0622 (ChiS-хитин-чувствительная гистидинкиназа),

VC0613 (N-ацетилгексозаминидаза) и VC2217 (N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза), которые, располагаясь на разных хромосомах, неизменно присутствовали у всех штаммов. Таким образом, несмотря на всевозможные изменения генов в составе хромосом, вибрионы сохраняли способность утилизировать хитин, благодаря хитиназе (ЕС 3.2.1.14) и N-ацетил-β-D-глюкозаминидазе (хитобиазе) (ЕС 3.2.1.30) у вибрионов, входящих в хитинолитический комплекс и играющих важную роль в сохранении и выживании вибрионов в объектах окружающей среды [1, 2, 7].

Таким образом, хитинолитический комплекс *V. cholerae* — это совокупность биологически активных полифункциональных компонентов клетки (включая ферменты), являющихся составной частью механизма выживания и сохранения вибрионов во внешней среде. Изучение его свойств будет способствовать дальнейшему пониманию особенностей биологии и экологии холерного вибриона. Результаты изучения комплекса найдут применение в прикладных и фундаментальных работах по исследованию механизмов сохранения и формирования новых форм вибрионов в окружающей среде, лучше адаптированных для выживания в экологических нишах.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Дуванова О.В., Мишанькин Б.Н., Водопьянов А.С., Сорокин В.М. N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза холерных вибрионов. Журн. микробиол. 2016, 2: 41-48.
2. Дуванова О.В., Мишанькин Б.Н., Сорокин В.М., Титова С.В. Оценка влияния температуры культивирования на активность N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы у холерных вибрионов. ЗНиСО, 2016, 4 (277): 42-44.
3. Журавлева Н.В., Лукьянов П.А. Хитинолитические ферменты: источники, характеристика и применение в биотехнологии. Вестник ДВО РАН. 2004, 3: 76-86.
4. Ильина А.В., Варламов В.П., Тихонов В.Е., Ямсков И.А., Даванков В.А. Выделение высокоочищенной хитиназы *Streptomyces kurssanovii* на модифицированном хитине. Биотехнология. 1992, 2: 25-28.
5. Малеев В.В., Особо опасные микозы. Волгоград, Волга-Паблишер, 2013.
6. Мишанькин Б.Н., Романова Л.В., Ломов Ю.М., Шиманюк Н.Я., Водопьянов С.О., Черепяхина И.Я., Сучков И.Ю., Дуванова О.В. *Vibrio cholerae* O139, выделенные от людей и из воды открытых водоемов. Журн. микробиол. 2000, 3: 3-7.
7. 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.
8. Скрябин К.Г. Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение. Москва, Наука, 2002.
9. Стояченко И.А., Варламов В.П. Очистка и некоторые свойства хитиназ из *Streptomyces kurssanovii*. Биотехнология. 1992, 2: 29-36.
10. Amako K., Shimodori S., Imoto T. et al. Effects of chitin and its soluble derivatives on survival of *Vibrio cholerae* O1 at low temperature. Appl. Environm. Microbiol. 1987, 3 (53), 603-605.
11. Appleby L.J., Nausch N., Bourke C.D. Chitinase 3-like 1 protein levels are elevated in *Schistosoma haematobium* infected children. PLoS Negl. Trop. Dis. 2012, 11 (6): e.1898, doi:10.1371.
12. Bassler B.L., Gibbons P.J., Yu C. et al. Chitin utilization by marine bacteria. Chemotaxis to chitin oligosaccharides by *Vibrio furnissii*. J. Biol. Chem. 1991. 36 (266): 24268-24275.
13. Bohr S., Petel S.J., Vasko R. et al. The role CHI3L1 (Chitinase 3-like-1) in the pathogenesis of infections in burns in a mouse model. PloS One. 2015, 11 (10): e.0140440. doi: 10137.
14. Colwell R. Global climate and infectious diseases: the cholera paradigm. Science. 1996, 274: 2025-2031.
15. Davis B., Eveleigh D. Chitosanases: occurrence, production and immobilization. Chitin, chitosan and related enzymes. Ed. Zikakis J.P. Orlando. Academic Press, 1984, p. 161-179.

16. Dela Cruz C.S., Lu W., He C.H. et al. Chitinase 3-like-1 promotes *Streptococcus pneumoniae* killing and augments host tolerance to lung antibacterial responses. *Cell Host Microbe*. 2012, 1: 34-46.
17. Di Rosa M., Distefano G., Zorena K. Chitinases and immunity: ancestral molecules with new functions. *Immunobiology*. 2016, 3 (221): 399-411.
18. Hunt D. E., Gevers D., Vahora N. M. et al. Conservation of the chitin utilization pathway in the Vibrionaceae. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008, 1 (74): 44-51.
19. Kaneko T., Colwell R.R. Adsorption of *Vibrio parahaemolyticus* onto chitin and zooplanktonic copepods. *Appl. Microbiol.* 1975, 29: 251-257.
20. Kaplan J.B., Rangunath C., Velliyagounder K. et al. Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemotherap.* 2004, 7 (48): 2633-2636.
21. Keyhani N. O., Roseman S. Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999, 1473: 108-122.
22. Keyhani N. O., Roseman S. The chitin catabolic cascade in the marine bacterium *Vibrio furnissii*. Molecular cloning, isolation and characterization of the periplasmic chitodextrinase. *J. Biol. Chem.* 1996, 52 (271): 33414-33424.
23. Kobayashi T., Koide O., Deguchi S. et al. Characterization of chitosanase of a deep biosphere *Bacillus* strain. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2011, 4 (75), 669-673.
24. Li X., Roseman S., Morita K., Fukumoto I. et al. The chitinolytic cascade in *Vibrios* is regulated by chitin oligosaccharides and two-component chitin catabolic sensor/kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004, 2 (101): 627-631.
25. Lipp E. K., Huq A., Colwell R. R. Effect of global climate on infectious diseases: the cholera model. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002, 15: 757-770.
26. Lo Scrudato M., Blokesch M. The regulatory network of natural competence and transformation of *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet.* 2012, 6: e1002778.
27. Low D., Subramaniam R., Aomatsu T. et al. Chitinase 3-like-1 induces survival and proliferation of intestinal epithelial cells during chronic inflammation and colitis-associated cancer by regulating S100A9. *Oncotarget.* 2015, 34 (6): 3635-3650.
28. Low D., Tran H.T., Dreux N. et al. Chitin-binding domains of *Escherichia coli* ChiA mediate interactions with intestinal epithelial cells in mice with colitis. *Gastroenterology.* 2013, 3 (145): 602-612.
29. Ma B., Herzog E.L., Lee C.G. et al. Role of chitinase 3-like-1 and semaphoring 7a in pulmonary melanoma metastasis. *Cancer Res.* 2015, 3 (75): 487-496.
30. Meibom K. L., Li X. B., Nielsen A. T. et al. The *Vibrio cholerae* chitin utilization program. *Proc. Soc. Acad. Sci. USA.* 2004, 8 (101): 2524-2529.
31. Moller H. Grelier S., Pardon P. et al. Antimicrobial and physicochemical properties of chitosan — HPMC — based films. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52: 6585-6591.
32. Nalin D. R., Daya V., Reid A. Adsorption and growth of *Vibrio cholerae* on chitin. *Infect. Immun.* 1979, 2 (25): 768-770.
33. Park J. K., Yamasaki Y., Nakagawa T. et al. Purification and characterization of the chitinase (ChiA) from *Enterobacter* sp. G-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1997, 61: 684-689.
34. Patil S. R., Ghormade V., Deshpande M. V. Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme Microb. Technol.* 2000, 26: 473-483.
35. Rabea E. J., Badawy M., Stevens C. V. et al. Chitosan as antimicrobial agents: Application and mode action. *Biomacromolecules* 2003, 6 (4): 1457-1465.
36. Reguera G., Kolter R. Virulence and environment: a novel role for *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pili in biofilm formation on chitin. *J. Bacteriol.* 2005, 10 (187): 3551-3555.
37. Reimann L., Azam F. Widespread N-acetyl-D-glucosamine uptake among pelagic marine bacteria and its ecological implications. *App. Environ. Microbiol.* 2002, 68: 5554-5562.
38. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* 2006, 31: 603-632.
39. Sahai A.S., Manocha M.S. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host parasite interaction. *FEMS Microbiol. Rev.* 1993, 11: 317-338.
40. Sikora A.E. Proteins secreted via the type II secretion system: smart strategies of *Vibrio cholerae* to maintain fitness in different ecological niches. *PLoS pathogens.* 2013, 2 (9): e1003126. doi:10.137.

41. Sun S., Tay S., Kjelleberg S.A. et al. Quorum sensing-regulated chitin metabolism provides grazing resistance to *Vibrio cholerae* biofilms. *ISME J.* 2015, 9 (8): 1812-1820.
42. Taira T., Ohnuma T., Yamagami T. et al. Antifungal activity of rye (*Secale cereale*) seed chitinases: the different binding manner of class I and class II chitinases to the fungal cell wall. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2002, 66: 970-977.
43. Tamayo R., Patimalla B., Camilli A. Growth in biofilm induces a hyperinfectious phenotype in *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 2010, 78 (8): 3560-3569.
44. Tarsi R., Pruzzo C. Role of surface proteins in *Vibrio cholerae* attachment to chitin. *Appl. Env. Microbiol.* 1999, 3 (66): 1348-1351.
45. Tran H.T., Barnich N., Mizoguchi E. Potential role of chitinase and chitin-binding proteins in host-microbial interactions during the development of intestinal inflammation. *Histol Histopathol.* 2011, 11 (26): 1453-1464.
46. Varnum S. M., Webb-Robertson B. J., Moore R.J. et al. Proteomic analysis of bronchoalveolar lavage fluid proteins from mice infected with *Francisella tularensis* ssp. *novicida*. *J. Proteome Res.* 2012, 7 (11): 3690-3703.
47. Watve S. S., Thomas J., Hammer B. K. CytR is global positive regulator of competence, type VI secretion, and chitinases in *Vibrio cholerae*. *PLoS One.* 2015, 10 (9): e0138834. eCollection 2015.
48. Yamamoto S., Izumiya H., Mitobe J. et al. Identification of a chitin-induced small RNA that regulates translation of the *tfoX* gene, encoding a positive regulator of natural competence in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2011, 8 (193): 1953-1965.

*Поступила 25.05.16*

Контактная информация: Дуванова Ольга Викторовна, к.б.н.,  
344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40, р.т. (8863)240- 22-66

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*И.П.Балмасова<sup>1,2</sup>, М.С.Аристанбекова<sup>2,3</sup>, Е.С.Малова<sup>1</sup>, Р.И.Сениашивили<sup>1</sup>*

## **МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВИРУСНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ У БОЛЬНЫХ, КОИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСАМИ ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА И ГЕПАТИТА С**

<sup>1</sup>Российский университет дружбы народов, Москва, <sup>2</sup>Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова; <sup>3</sup>Саратовский областной центр профилактики и борьбы со СПИД

У больных, пораженных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), в 20 — 30% случаев наблюдается коинфицирование вирусом гепатита С (ВГС), что связано с общностью путей передачи возбудителей. Основной причиной летальности коинфицированных пациентов является поражение печени. В связи с этим, особое значение приобретает анализ механизмов взаимного влияния ВИЧ и ВГС в условиях коинфицирования, которые можно рассматривать как с точки зрения прямого межмолекулярного взаимодействия двух вирусных возбудителей, так и с позиций их иммуноопосредованного эффекта. Негативное влияние ВИЧ на течение фиброзного процесса в печени при ВГС-инфекции связано со свойством этого вируса вызывать глубокие изменения в иммунной системе путем прямого повреждения CD4+ клеток, нарушения механизмов иммунологической памяти, подавления функций печеночных фракций ЕК и ЕКТ, а также с его способностью корешепторного взаимодействия с гепатоцитами и звездчатыми клетками, усиливающими прогрессирование фиброзных изменений и репликацию ВГС в печени. Установлено, что ВГС также влияет на репликацию ВИЧ, стимулирует инфицирование макрофагов этим вирусом. Все эти явления способствуют росту летальности при коинфицировании ВИЧ и ВГС.

Журн. микробиол., 2016, № 5, С. 101—109

Ключевые слова: вирусные возбудители, ВИЧ, вирус гепатита С, коинфекция

## **MECHANISMS OF INTERACTION OF VIRAL CAUSATIVE AGENTS IN PATIENTS CO-INFECTED WITH HUMAN IMMUNODEFICIENCY AND HEPATITIS C VIRUSES**

<sup>1</sup>Russian University of Peoples' Friendship, Moscow, <sup>2</sup>Evdokimov Moscow State Medical-Stomatological University; <sup>3</sup>Saratov Regional Centre for Prophylaxis and Control of AIDS, Russia

In patients infected with human immunodeficiency virus (HIV) in 20 — 30% of cases co-infection with hepatitis C virus (HCV) is observed, that is associated with common routes of transmission for these causative agents. The main cause of lethal outcome for co-infected patients is liver damage. Thus, analysis of mechanisms of mutual influence of HIV and HCV under the conditions of co-infection gains special attention, that can be examined from both standpoints of direct intermolecular interaction of 2 viral causative agents, as well as from the position of their immune-mediated effect. Negative effect of HIV on the course of fibrosis process in liver during HCV infection is associated with the feature of this virus to cause deep alteration in the immune system by direct damage of CD4+ cells, disruption of mechanisms of immunological memory, suppression of functions of liver fraction of NK and NKT, as well as its ability of co-receptor interaction with hepatocytes and stellate cells, enhancing progress of fibrosis alterations and HCV replication in liver. HCV is also established to effect replication of HIV, stimulate infection of macrophages with this virus. All these events facilitate the rise in lethality during HIV and HCV co-infection.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 5, P. 101—109

Key words: viral causative agents, human immunodeficiency virus, hepatitis C virus, co-infection

К настоящему времени 33,3 млн человек Земли поражены вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), около 20 — 30% из них инфицированы еще и вирусом гепатита С (ВГС) [18, 38].

Исследование коинфекции ВИЧ/ВГС показало, что возбудители в значительной мере влияют друг на друга. Введение в клиническую практику 20 лет назад высокоактивной антиретровирусной терапии значительно повлияло на продолжительность жизни ВИЧ-инфицированных пациентов и вывело на первый план роль хронического гепатита С как наиболее частого коморбидного состояния и одну из главных причин прогрессирования заболевания в его наиболее тяжелую форму [15]. Медицинские работники столкнулись с фактом, что коинфекция ВИЧ/ВГС имеет не только более тяжелое течение, но и в значительной степени определяет летальность среди пациентов [39]. Оказалось, что ВИЧ-инфекция многократно (в 2 — 5 раз) увеличивает частоту перехода острого гепатита С в хроническую форму, способствует развитию цирроза печени, гепатоклеточной карциномы, декомпенсации печени вплоть до полной потери ее жизненно важных функций [40, 41].

С этой точки зрения расшифровка механизмов взаимодействия возбудителей при коинфекции ВИЧ/ВГС становится весьма актуальной.

### **Распространение и эпидемиология коинфекции ВИЧ/ВГС.**

Заболевания печени — вторая по частоте причина летальности больных ВИЧ-инфекцией в Западных странах, а причиной поражения печени у таких больных чаще всего становится вирусный гепатит С. Так, в США 25% из 1,2 млн ВИЧ-инфицированных пациентов коинфицированы ВГС [13]. В Канаде коинфекция ВИЧ и ВГС развивается у 20 — 30% ВИЧ-инфицированных лиц, приводя к более тяжелому течению заболевания и росту летальности [19]. В

Европе и Азии доля ВГС-коинфекции среди ВИЧ-инфицированных лиц, употребляющих инъекционные наркотические препараты, превышает 90% [13]. Доля коинфицированных пациентов среди этой когорты колебалась от 9,8% в Парагвае до 97% в Мексике. Среди стран с самым высоким уровнем коинфицирования в группе потребителей инъекционных наркотических средств оказались Китай, Россия, США — 67; 72,5 и 73,4%, соответственно [23]. В России, по разным оценкам, около 15% людей с ВИЧ имеют также и гепатит С [5].

Столь частое сочетание названных вирусных агентов связано, в первую очередь, с общностью путей их передачи. В настоящее время основной путь передачи как ВИЧ, так и ВГС — парентеральный, в связи с этим, особенно высокая степень поражения коинфекцией ВИЧ/ВГС наблюдается у потребителей наркотических инъекционных препаратов, у которых она достигает 90% [18].

На долю полового пути передачи ВГС приходится около 2 — 8%. Коинфекции, передаваемые половым путем, в частности, вызванные ВИЧ и ВГС, ассоциированы с атипичным и более тяжелым течением, чаще дают осложнения и неблагоприятные исходы, устойчивы к лечению, имеют худший прогноз [31].

Существует еще и вертикальный путь передачи ВГС от матери к плоду, который наблюдается в 2 — 5% случаев, риск такой передачи значительно возрастает, если мать коинфицирована ВИЧ [35]. К настоящему времени установлено, что риск перинатальной передачи ВГС от матерей с коинфекцией ВИЧ и ВГС повышается не меньше, чем в 3 раза, по сравнению с матерями, инфицированными только ВГС. Наличие гепатита С при этом не увеличивает риск передачи ВИЧ от матери к ребенку [2].

К факторам риска прогрессирования фиброза печени при коинфекции ВИЧ/ВГС относят преклонный возраст, злоупотребление алкоголем, вирусные коинфекции, переизбыток, инсулиноустойчивость, стеатоз печени [10, 32]. При коинфекции чаще возникают коморбидные состояния, включающие заболевания сердечно-сосудистой системы, поражения нервной системы, почек, остеопороз, переломы, диабет [35]. Что же касается хронического поражения печени, то в его развитии огромная роль при коинфицировании принадлежит генетическим особенностям пациента [18, 37, 42].

Однако главным фактором, определяющим прогрессирующий характер поражения печени у коинфицированных ВИЧ/ВГС пациентов, остается вирус иммунодефицита человека. Негативное влияние ВИЧ-инфекции на гепатит С проявляется в виде склонности к персистенции ВГС, устойчивости больных к терапии ВГС-инфекции интерфероном [18]. У коинфицированных пациентов вирусная нагрузка ВГС выше, чем при моноинфекции, но различий в генотипах ВГС между коинфицированными и моноинфицированными не отмечено [3]. Отмечено влияние падения числа CD4+ клеток на риск развития коинфекции, особенно при значениях ниже 500 клеток/мл [49, 50]. В то же время, влияние ВГС на течение ВИЧ-инфекции многими авторами оспаривается, хотя и есть сведения о том, что оно проявляется ростом ВИЧ-ассоциированной и не ВИЧ-ассоциированной летальности [21].

**Молекулярные механизмы взаимодействия ВИЧ и ВГС в процессе коинфицирования.**



ВИЧ и ВГС различаются как механизмами внутриклеточной репликации, так и клеточными мишенями воздействия. Если ВГС — гепатотропный вирус, то ВИЧ поражает клетки иммунной системы, такие как CD4+ Т-лимфоциты и моноциты/макрофаги. Однако исследования последних лет, в том числе посвященные коинфицированию этими вирусами, значительно изменили такие абсолютизированные взгляды на клеточные мишени вирусного поражения. Было установлено, что ВГС реплицируется и за пределами печени [43], в том числе и в клетках иммунной системы, в то время как ВИЧ инфицирует как гепатоциты, так и звездчатые клетки печени, отвечающие за развитие фиброзных процессов [24].

В соответствии с этими данными взаимодействие ВИЧ и ВГС при коинфицировании можно рассматривать в двух аспектах — с точки зрения прямого межмолекулярного взаимодействия двух вирусных возбудителей и иммуноопосредованного взаимодействия, хотя очень часто между этими подходами довольно трудно провести четкую грань.

Геном ВИЧ кодирует три основных полипротеина: Gag, Pol и Env. Полипротеин Gag впоследствии расщепляется на белки, входящие в состав матриксного каркаса и нуклеокапсида, а Env дает начало gp120 и gp41. Полипротеин Pol является предшественником ферментов протеазы, обратной транскриптазы и интегразы. Кроме того, с геномом ВИЧ связаны регуляторные белки Tat и Rev, а также дополнительные белки Vif, Vpr, Vpu и Nef с регуляторными функциями [9].

Геном ВГС представлен одноцепочечной РНК, участвует в репликации ВГС, а также в процессах трансляции с последующим синтезом вирусных белков (3 структурных и 7 неструктурных), прикрепляясь к рибосомам. Основным структурным белком ВГС является белок С (белок кора), образующий во взаимодействии с вирусной РНК нуклеокапсид, имеющий массу регуляторных функций. Кроме того, структурными белками ВГС являются гликопротеиды оболочки — E1 и E2, которые отвечают за присоединение к тетраспанину (CD81) и ряду других рецепторов на гепатоцитах человека. Неструктурные белки NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B ВГС вовлечены в процессы репликации вирусного генома [44].

При коинфекции белки ВИЧ оказывают довольно выраженное влияние на ВГС. В частности, gp120 ВИЧ увеличивает ВГС репликацию CXCR4- или CCR5-зависимым путем, Rev увеличивает экспрессию гена ВГС через IRES сайт РНК, Tat активизирует ВГС репликацию через влияние на рост IP-10 [27], Nef стимулирует репликацию ВГС опосредованно, увеличивая образование активных кислородных радикалов [22, 33]. Vpr усиливает репликацию ВГС, повышая экспрессию определенных регуляторных молекул микроРНК (miR-122) [36].

Структурные и регуляторные компоненты ВГС, в свою очередь, тоже могут оказывать влияние на ВИЧ. Так, белки кора ограничивают транскрипцию ВИЧ-1 и модулируют вирусную репликацию через подавление накопления Tat белка, снижают активность региона LTR (откуда начинается транскрипция) ВИЧ-1 в присутствии высокого уровня ФНО $\alpha$ , взаимодействуют с Nef ВИЧ-1 и через сигнальные пути TRAFs (ФНО рецептор-активирующие факторы) усиливают репликацию ВИЧ-1 в макрофагах, индуцируют ВИЧ-1 репликацию через ФНО $\alpha$  и ИЛ-6 [33]. Неструктурные белки ВГС (особенно

NS3/4A) активируют транскрипцию ВИЧ-1. Запуск транскрипции ВИЧ с участием NS3/4A происходит вследствие взаимодействия с *Upr* ВИЧ-1, так как *Upr* вызывает деградацию NS3/4A, при этом NS3, локализуемый в виде комплекса в цитоплазме клеток, высвобождается и перемещается в ядро, где происходит активация транскрипции ВИЧ [25, 45].

**Иммуноопосредованные механизмы взаимодействия ВИЧ и ВГС в процессе коинфицирования.**

Иммуноопосредованные механизмы взаимодействия ВИЧ и ВГС обеспечивают более высокий риск хронизации ВГС-инфекции и более высокий уровень РНК ВГС, что объясняется вызванным ВИЧ падением эффективности CD4 и CD8 Т-клеточного ответа на ВГС у коинфицированных пациентов, связанным, прежде всего, с нарушением механизмов формирования иммунологической памяти [28, 29].

Установлено, что уровень вирусной нагрузки ВГС у коинфицированных пациентов выше, он коррелирует с числом CD4+ клеток, но не играет роли в прогрессировании поражения печени, хотя и имеет значение для ответа на терапию пегилированным ИФН $\alpha$  и рибавирином [14].

Хотя иммуноопосредованное влияние ВГС на ВИЧ-инфекцию еще находится на стадии активного обсуждения, в литературе уже появились сведения, например, о том, что белки кора ВГС усиливают инфицирование макрофагов ВИЧ-1 [46], а также, что иммунологический ответ после антиретровирусной терапии усиливается при коинфицировании ВГС [48].

Оба возбудителя относятся к РНК-содержащим вирусам, а вирусная РНК распознается с помощью Toll-подобных рецепторов или с участием геликазы индуцибельного гена I ретиноидной кислоты (RIG-I) [51]. Эти взаимодействия приводят к активации сигнальных путей, запускающих в клетках синтез интерферонов I типа (ИФН $\alpha/\beta$ ) и другие противовирусные эффекты, являющиеся первым проявлением врожденного иммунного ответа против внутриклеточных патогенов. С другой стороны, неструктурные белки ВГС (NS3/4, NS5A), гликопротеины его конверта (E2 и др.) обладают способностью вызывать глубокие нарушения сигнальных путей интерферонов I типа [16]. Способностью негативно влиять на сигнальные пути интерферонов I типа, реализуемые через TLR7 и TLR8, обладают и белки ВИЧ-1 (в первую очередь, Tat) [52].

Одна из функций интерферонов I типа этих цитокинов — активация естественных киллеров в месте локализации вируса [6]. В печени доля естественных киллеров (ЕК) наиболее велика среди всех лимфоцитов и еще больше возрастает при вирусной персистенции. При коинфекции секреторные функции ЕК и ЕКТ как важнейших представителей врожденного иммунного ответа нарушаются [3, 4, 9, 18, 26].

**Коинфекция ВИЧ/ВГС и иммунопатогенез поражения печени.**

Развитие ВИЧ/ВГС коинфекции приводит к тяжелому поражению печени — прогрессирующему фиброгенезу. Фиброгенез — универсальный процесс, основу которого составляет избыточное отложение протеинов внеклеточного матрикса, в первую очередь, коллагенов, в тканях различных органов. Ключевой клеткой фиброзных изменений в печени служат звездчатые клетки (стеллатоциты), активация которых происходит, прежде всего, с участием клеток врожденного иммунитета (купферовских клеток, ЕК, ЕКТ) и реализуется в виде способности отвечать на воздействия цитокинов и различных

факторов роста продукцией коллагена [26]. Параллельно запускается повреждение клеток печени иммунологическими механизмами и развитие апоптотических изменений в печени под влиянием белков ВГС [4].

В прогрессировании фиброза в цирроз печени при коинфекции ВИЧ/ВГС большую роль играет падение числа CD4 Т-клеток [18]. Механизм, благодаря которому уменьшение числа CD4+ клеток запускает фиброз, объясняется снижением секреции ИФН $\gamma$  (противофиброзный цитокин) CD8+ Т-клетками при падении числа CD4+. Дело в том, что одноцепочечная РНК ВИЧ активирует TLR лимфоцитов и дендритных клеток, приводит к поликлональной активации В-клеток, росту множественной экспрессии активационных маркеров CD4 и CD8, истощению пула CD4+ Т-клеток [20].

В освобождении организма от вирусных возбудителей ведущая роль принадлежит CD8+ Т-клеткам с их цитотоксической функцией [9]. При коинфекции исследователи отмечают «двойной» эффект ВИЧ-специфических CD8+ Т-лимфоцитов, которые накапливаются в печени коинфицированных ВИЧ/ВГС пациентов и высвобождают цитокины профиброзного действия. В результате возникает дисбаланс CD4 и CD8 клеточного ответа, а нарушение соотношения этих клеток коррелирует с модификацией цитокиновой сети (увеличение секреции профиброзного ТФР $\beta$  и снижение противофиброзного ИФН $\gamma$ ) [30].

Кроме того, ВИЧ и ВГС индуцируют продукцию активных кислородных радикалов, которые активируют в клетках сигнальные системы с участием митоген-активированной протеинкиназы (МАРК) и таким образом усиливают секрецию ТФР $\beta$ , супрессирующего иммунный ответ и обладающего профиброзным действием [34].

ВИЧ воздействует на гепатоциты и звездчатые клетки печени через рецепторы для gp120 — С-С хемокиновый рецептор 5 типа (CCR5) и С-Х-С хемокиновый рецептор 4 типа (CXCR4) [30]. Это запускает апоптоз гепатоцитов, секрецию гепатоцитами хемокина ИЛ-8, провоспалительный и профиброзный эффекты на звездчатые клетки печени и их направленную миграцию [12].

Белки ВГС, в частности, входящие в состав кора и NS3, также вносят свою лепту в развитие фиброза печени. Через Toll-подобные рецепторы 2 типа и интерлейкин-1 рецептор-ассоциированную киназу способствуют активной секреции провоспалительных цитокинов и хемокинов звездчатыми клетками печени [30].

Недавние исследования позволили выяснить, что выраженное снижение числа CD4+ Т-клеток в лимфоидных органах желудочно-кишечного тракта способствует массивному проникновению микробов через поврежденный эпителий, а их продукты, в частности, ЛПС попадают в кровоток. ЛПС, в свою очередь, усиливает фиброзные изменения в печени через активацию купферовских клеток, что способствует нарастанию воспалительных процессов в печени, клеточному апоптозу и, в конечном итоге, фиброгенезу [11, 26].

Вносят свой вклад в развитие фиброза печени и естественные киллеры, и ЕКТ, дисрегуляция функции которых способствует профиброзным эффектам [1, 3, 4]. В частности, белок ВГС Е2, взаимодействующий с рецептором для этого вируса — молекулой CD81, нарушает функции других рецепторов ЕК через перекрестное взаимодействие, что приводит к подавлению цитотокси-

ческих свойств этих клеток и нарушению синтеза ими ИФН $\gamma$ , препятствующего фиброзу. С другой стороны, ВИЧ, вызывая уменьшение числа и дисфункцию CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, ограничивает функции ЕК и способствует фиброзу печени через регуляцию синтеза «нетипичных» цитокинов профиброзного действия, в первую очередь, ИЛ-13 [7, 8, 17, 47].

При высокой глобальной распространенности ВИЧ и ВГС оба возбудителя имеют общие пути передачи, что повышает возможность коинфицирования.

Несмотря на успехи современной антиретровирусной терапии, заболевания печени остаются одной из главных проблем и причин летальности у ВИЧ/ВГС коинфицированных пациентов.

Взаимодействие ВИЧ и ВГС при коинфицировании можно рассматривать как с точки зрения прямого межмолекулярного взаимодействия двух вирусных возбудителей, так и с позиций иммуноопосредованного взаимодействия. Оба возбудителя обладают способностью стимулировать репликацию друг друга, а иммунная дисфункция, вызванная ВИЧ, создает условия для прогрессирования фиброзных изменений в печени.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Балмасова И.П., Ющук Н.Д., Сафиуллина Н.Х., Малова Е.С., Федосеева Н.В. Иммунофенотип и генотип в патогенезе и лечении хронического гепатита С. Российский иммунологический журнал. 2014, 8 (17): 772-775.
2. Бикмураметов Д.А. Гепатит С и ВИЧ-инфекция: профилактика, диагностика, лечение. М., Фонд развития межсекторного социального партнерства, 2010.
3. Вышеславцева М.В., Балмасова И.П., Шестакова И.В. Иммунопатогенетические особенности коинфицирования вирусами иммунодефицита человека и гепатита С. Здоровье населения и среда обитания. 2015, 2 (263): 36-38.
4. Малова Е.С., Ющук Н.Д., Балмасова И.П., Шмелева Е.В. CD56<sup>+</sup> лимфоциты и иммунопатогенез хронического гепатита С. Иммунология. 2010, 31: 310-315.
5. Покровский В.И., Жебрун А.Б. (ред.). Вирусные гепатиты в Российской Федерации. 8 выпуск. Санкт-Петербург, НИИЭМ им. Пастера, 2011.
6. Сепиашвили Р.И. Физиология иммунной системы. М., Медицина — Здоровье, 2015.
7. Сепиашвили Р.И., Балмасова И.П. Естественные киллеры и биогенные амины: паракринная регуляция в иммунной системе. Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова. 2005, 8: 927-932.
8. Сепиашвили Р.И., Балмасова И.П. Иммунные синапсы: от теории к клинической практике. Молекулярная медицина. 2008, 1: 14-22.
9. Ярилин А.А. Иммунология. М., ГЭОТАР-Медиа, 2010.
10. Bailony M.R., Scherzer R., Huhn G. et al. Association of HIV infection, hepatitis C virus infection, and metabolic factors with liver stiffness measured by transient elastography. J. Infectious Diseases. 2013, 208: 1776-1783.
11. Brenchley J.M., Price D.A., Schacker T.W. et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. Nature Medicine. 2006, 12: 1365-1371.
12. Bruno R., Galastri S., Sacchi P. et al. gp120 modulates the biology of human hepatic stellate cells: a link between HIV infection and liver fibrogenesis. Gut. 2010, 59: 513-520.
13. Chen J.Y., Feeney E.R., Chung R.T. HCV and HIV co-infection: mechanisms and management. Nature Rev. Gastroenterology Hepatology. 2014, 11: 362-371.
14. Corchado S., López-Cortés L.F., Rivero-Juárez A. et al. Liver fibrosis, host genetic and hepatitis C virus related parameters as predictive factors of response to therapy against hepatitis C virus in HIV/HCV coinfecting patients. PLoS One. 2014, 9: e101760.
15. Coppola N., Martini S., Pisaturo M., Sagnelli C. et al. Treatment of chronic hepatitis C in patients with HIV/HCV coinfection. World J. Virology. 2015, 4: 1-12.
16. Gonzalez V.D., Landay A.L., Sandberg J.K. Innate immunity and chronic immune activation in HCV/HIV-1 co-infection. Clinical Immunology. 2010, 135: 12-25.
17. Glässner A., Eisenhardt M., Kokordelis P. et al. Impaired CD4<sup>+</sup> T cell stimulation of NK cell

- anti-fibrotic activity may contribute to accelerated liver fibrosis progression in HIV/HCV patients. *J. Hepatology*. 2013; 59: 427-433.
18. Hernandez M.D., Serman K.E. HIV/HCV coinfection natural history and disease progression, a review of the most recent literature. *Current Opinion HIV AIDS*. 2011, 6: 478-482.
  19. Hull M., Shafraan S., Tseng A. et al. CIHR canadian HIV trials network co-infection and concurrent diseases core: Updated canadian guidelines for the treatment of hepatitis C infection in HIV-hepatitis C coinfecting adults. *Canadian J. Infectious Diseases Medical Microbiology*. 2014, 25: 311-320.
  20. Herbeuval J.P., Grivel J.C., Boasso A. et al. CD4 T-cell death induced by infectious and non-infectious HIV-1: role of type 1 interferon-dependent, TRAIL/DR5-mediated apoptosis. *Blood*. 2005, 106: 3524-3531.
  21. Ingiliz P., Rockstroh J.K. Natural history of liver disease and effect of hepatitis C virus on HIV disease progression. *Current Opinion HIV AIDS*. 2015, 10: 303-308.
  22. Ivanov A.V., Bartosch B., Smirnova O.A. et al. HCV and oxidative stress in the liver. *Viruses*. 2013, 5: 439-469.
  23. Karageorgopoulos D.E., Allen J., Bhagani S. Hepatitis C in human immunodeficiency virus co-infected individuals: Is this still a «special population»? *World J. Hepatology*. 2015, 7: 1936-1952.
  24. Kong L., Cardona Maya W., Moreno-Fernandez M.E. et al. Low-level HIV infection of hepatocytes. *Virology J*. 2012, 9: 157.
  25. Kang L., Luo Z., Li Y. et al. Association of Vpu with hepatitis C virus NS3/4A stimulates transcription of type 1 human immunodeficiency virus. *Virus Research*. 2012, 163: 74-81.
  26. Krizhanovsky V., Yon M., Dickens R.A. et al. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell*. 2008, 134: 657-667.
  27. Liberto M.C., Zicca E., Pavia G. et al. Virological mechanisms in the coinfection between HIV and HCV. *Mediators Inflammation*. 2015, 2015: 1-7.
  28. Loko M.A., Salmon D., Carrieri P. et al. The French national prospective cohort of patients coinfecting with HIV and HCV (ANRS CO13 HEPAVIH): early findings 2006 — 2010. *BMC Infectious Diseases*. 2010, 10: 303.
  29. Lopez-Dieguez M., Montes M.L., Pascual-Pareja J.F. et al. The natural history of liver cirrhosis in HIV/HCV coinfecting patients. *AIDS*. 2011, 25: 899-904.
  30. Lin W., Tsai W.L., Shao R.X. et al. Hepatitis C virus regulates transforming growth factor beta1 production through the generation of reactive oxygen species in a nuclear factor kappaB-dependent manner. *Gastroenterology*. 2010, 138: 2509-2518.
  31. Marschalkó M., Pónyai K., Kárpáti S. Sexually transmitted coinfections. *HIV coinfections. Orv Hetil*. 2015, 156: 4-9.
  32. Marcellin F., Roux P., Loko M.A. et al. High levels of alcohol consumption increase the risk of advanced hepatic fibrosis in HIV/hepatitis C virus-coinfecting patients: a sex-based analysis using transient elastography at enrollment in the HEPAVIH ANRS CO13 cohort. *Clinical Infectious Diseases*. 2014, 59: 1190-1192.
  33. Ming-Ju H., Yih-Shou H., Tzy-Yen C., Hui-Ling C. Hepatitis C virus E2 protein induce reactive oxygen species (ROS)-related fibrogenesis in the HSC-T6 hepatic stellate cell line. *J. Cell Biochemistry*. 2011, 112: 233-243.
  34. Mastroianni C.M., Lichtner M., Mascia C. et al. Molecular mechanisms of liver fibrosis in HIV/HCV coinfection. *International J. Molecular Sciences*. 2014, 15: 9184-9208.
  35. Operskalski E.A., Kovacs A. HIV/HCV co-infection: pathogenesis, clinical complications, treatment, and new therapeutic technologies. *Current HIV/AIDS Reports*. 2011, 8: 12-22.
  36. Peng M., Xiao X., He Y. et al. HIV Vpr protein upregulates microRNA-122 expression and stimulates hepatitis C virus replication. *J. General Virology*. 2015, 96: 2453-2463.
  37. Rohrbach J., Robinson N., Harcourt G. et al. Cellular immune responses to HCV core increase and HCV RNA levels decrease during successful antiretroviral therapy. *Gut*. 2010, 59: 1252-1258.
  38. Sherman K.E., Thomas D.L., Chung R.T. Human immunodeficiency virus and liver disease forum 2010: conference proceedings. *Hepatology*. 2011, 54: 2245-2253.
  39. Smith C., Sabin C.A., Lundgren J.D. et al. *AIDS*. 2010, 24: 1537-1548.
  40. Sagnelli C., Uberti-Foppa C., Galli L. *Brazilian J. Infectious Diseases*. 2014, 18: 164-169.
  41. Sagnelli C., Uberti-Foppa C., Pasquale G. et al. Factors influencing liver fibrosis and necroin-

- flammation in HIV/HCV coinfection and HCV mono-infection. *Infection*. 2013, 41: 959-967.
42. Sajadi M.M., Shakeri N., Talwani R., Redfield R.R. Hepatitis C infection in HIV-1 natural viral suppressors. *AIDS*. 2010, 24: 1689-1695.
  43. Sengupta S., Powell E., Kong L., Blackard J.T. Effects of HCV on basal and Tat-induced HIV LTR activation. *PLoS ONE*. 2013, 8: e64956.
  44. Sharma S.D. Hepatitis C virus: molecular biology and current therapeutic options. *Indian Journal Medical Research*. 2010, 131: 17-34.
  45. Simmonds P. The origin of hepatitis C virus. *Current Topics Microbiology Immunology*. 2013, 369: 1-15.
  46. Swaminathan G., Pascual D., Rival G. et al. Hepatitis C virus core protein enhances HIV-1 replication in human macrophages through TLR2, JNK, and MEK1/2-dependent upregulation of TNF- $\alpha$  and IL-6. *FEBS Letters*. 2014, 588: 3501-3510.
  47. Szereday L., Meggyes M., Halasz M. et al. Immunological changes in different patient populations with chronic hepatitis C virus infection. *World J. Gastroenterology*. 2016, 22: 4848-4859.
  48. Tsiara C.G., Nikolopoulos G.K., Dimou N.L. et al. Effect of hepatitis C virus on immunological and virological responses in HIV-infected patients initiating highly active antiretroviral therapy: a meta-analysis. *J. Viral Hepatology*. 2013, 20: 715-724.
  49. Wandeler G., Gsponer T., Bregenzer A. et al. Hepatitis C virus infections in the swiss HIV Cohort Study: a rapidly evolving epidemic. *Clinical Infectious Diseases*. 2012, 55: 1408-1416.
  50. Witt M.D., Seaberg E.C., Darilay A. et al. Incident hepatitis C virus infection in men who have sex with men: a prospective cohort analysis, 1984-2011. *Clinical Infectious Diseases*. 2013, 57: 77-84.
  51. Yang D.R., Zhu H.Z. Hepatitis C virus and antiviral innate immunity: who wins at tug-of-war? *World J. Gastroenterology*. 2015, 21: 3786-3800.
  52. Yoon C.H., Kim S.Y., Byeon S.E. et al. p53-derived host restriction of HIV-1 replication by protein kinase R-mediated tat phosphorylation and inactivation. *J. Virology*. 2015, 89: 4262-4280.

*Поступила 01.05.16*

Контактная информация: Балмасова Ирина Петровна, д.м.н., проф.,  
127473, Москва, Делегатская ул., 20/1

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*Т.П.Оспельникова<sup>1</sup>, Е.М.Носейкина<sup>2</sup>, Л.А.Гайдерова<sup>3</sup>, Ф.И. Ершов<sup>1</sup>*

## **ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ПРЕПАРАТОВ АЛЬФА ИНТЕРФЕРОНОВ ПРИ СОЦИАЛЬНО-ЗНАЧИМЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЧЕЛОВЕКА ВИРУСНОЙ ЭТИОЛОГИИ**

<sup>1</sup>Федеральный НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, Москва,  
<sup>2</sup>Всероссийский НИЦ по безопасности биологически активных веществ, Старая Купавна,  
Московская обл., <sup>3</sup>НЦЭСМП, Москва

Интерфероны (ИФН) относятся к ключевым цитокинами врожденного и приобретенного иммунитета и играют важную роль в противовирусной и противоопухолевой защите. Вместе с тем, они обладают выраженным иммуномодулирующим, антипролиферативным и антифибротическим действием. В обзоре рассмотрена общая сравнительная характеристика ИФН I типа ( $\alpha/\beta$ ), ИФН II типа ( $\gamma$ ) и ИФН III типа ( $\lambda$ ) человека и нозологическая направленность созданных на их основе современных лекарственных средств. Представлены эпидемиологические показатели для основных социально-значимых заболеваний человека вирусной этиологии: гриппа и других ОРВИ, герпетической инфекции, хронических вирусных гепатитов В, С и D. Основное внимание уделено анализу

эффективности терапевтического применения препаратов на основе ИФН $\alpha$  при указанных инфекциях, перечислен спектр основных индуцируемых ИФН $\alpha$  побочных эффектов. Рассмотрены последние достижения на пути создания принципиально новых лекарственных средств на основе ИФН, обладающих меньшей токсичностью и большей клинической эффективностью, а также перспективы применения препаратов на основе рекомбинантных ИФН для лечения потенциально опасных заболеваний.

Журн. микробиол., 2016, № 5, С. 109—121

Ключевые слова: грипп, хронический гепатит, герпесвирусная инфекция, интерфероны, терапия ИФН $\alpha$

*T.P.Ospelnikova<sup>1</sup>, E.M.Noseikina<sup>2</sup>, L.A.Gaiderova<sup>3</sup>, F.I.Ershov<sup>1</sup>*

## **THERAPEUTIC POTENTIAL OF ALPHA-INTERFERON PREPARATIONS DURING SOCIALLY-SIGNIFICANT HUMAN DISEASES OF VIRAL ETIOLOGY**

<sup>1</sup>Gamaleya Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow; <sup>2</sup>All-Russian Scientific Centre for Safety of Biologically Active Substances, Staraya Kupavna, Moscow Region; <sup>3</sup>Scientific Centre of Expertise of Means for Medical Use, Moscow, Russia

Interferons (IFN) belong to key cytokines of innate and adaptive immune response and play an important role in anti-viral and anti-tumor protection. At the same time, they possess a pronounced immune-modulating, anti-proliferative and anti-fibrotic effect. A general comparative characteristic of human IFN type I ( $\alpha/\beta$ ), IFN type II ( $\gamma$ ) and IFN type III ( $\lambda$ ) and nosological directionality of contemporary drugs created on their base is examined in the review. Epidemiologic parameters for main socially-significant human diseases of viral etiology are presented: influenza and other ARVIs, herpes infection, chronic viral hepatitis B, C and D. Main attention is given to analysis of effectiveness of therapeutic application of preparations based on IFN $\alpha$  during the indicated infections, a specter of main IFN $\alpha$  induced side effects is listed. Recent achievements on the path of creation of principally new drugs based on IFN, that have lower toxicity and higher clinical effectiveness, as well as perspectives of application of preparations based on recombinant IFN for therapy of potentially dangerous diseases are examined.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 5, P. 109—121

Key words: influenza, chronic hepatitis, herpes virus infection, interferons, IFN $\alpha$  therapy

**Сравнительная характеристика интерферонов человека.** Интерфероны (ИФН) представляют собой наиболее изученную группу цитокинов, выполняющих центральную роль в регуляции межклеточных взаимодействий при развитии реакций клеточного иммунитета, а также в морфо-функциональной интеграции иммунной системы с другими системами организма [3, 24]. В настоящее время считается, что система ИФН (гены ИФН и гены, индуцируемые ими, а также факторы, которые регулируют эти процессы) является обобщенным сигналом тревоги клеточного стресса.

В соответствии с молекулярной структурой, локализацией в хромосомах и механизмом активации уникальных рецепторных комплексов интерфероны подразделяются на 3 типа: ИФН I типа ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\omega$ ,  $\epsilon$ ,  $\kappa$ ), ИФН II типа ( $\gamma$ ) и ИФН III типа ( $\lambda$ ). Разные типы ИФН имеют также некоторые отличия в источниках происхождения и характеризуются определенными особенностями функциональной активности [24, 30]. Так, ИФН $\alpha$  синтезируется преимущественно лейкоцитами периферической крови, ИФН $\beta$  — фибробластами и эпителиоцитами, ИФН $\kappa$  — кератиноцитами, ИФН $\gamma$  — Т-лимфоцитами (Th1) и натураль-

ными киллерами (НК). Выявлено, что при вирус-индуцированном иммунном ответе основным источником синтеза ИФН I типа становятся плазматоидные дендритные клетки крови [45]. Идентифицированный в 2002 — 2003 годах ИФН III типа (ИФН $\lambda$ ), в настоящее время представленный несколькими подтипами ( $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$ ,  $\lambda_3$  и  $\lambda_4$ ) [24], демонстрирует заметное сходство с ИФН $\alpha$  по первичной биологической активности. Так, ИФН I и III типа синтезируются в ответ на инфицирование клеток как РНК-, так и ДНК-содержащими вирусами и активируют механизмы противовирусной защиты близлежащих клеток, сохраняя их устойчивость к инфицирующему агенту на 1 — 2 сут [32, 35, 41]. Спектр противовирусной активности ИФН $\lambda$  достаточно широк, а его антипролиферативный противоопухолевый эффект был продемонстрирован неоднократно в различных модельных системах с использованием опухолевых клеток как мыши, так и человека [24]. Однако в отличие от рецепторов к ИФН I типа, представленных практически на всех клетках организма, плотность экспрессии рецепторов к ИФН $\lambda$  проявляет заметную тканевую и цитологическую специфичность. Так, показано, что рецепторы к ИФН $\lambda$  в основном представлены эпителиоцитами бронхолегочной системы и желудочно-кишечного тракта, а также гепатоцитами печени [30]. Выявленная особенность позволила выдвинуть предположение об уменьшении выраженности системных ИФН-индуцированных токсических эффектов при сохранении позитивного фармакологического действия в случае клинического применения ИФН $\lambda$  [44], что указывает на перспективность разработки препаратов на его основе в качестве альтернативы ИФН $\alpha$  как средства специфической противовирусной терапии, а также для лечения некоторых форм рака.

ИФН II типа, представленный ИФН $\gamma$ , обладает более выраженной по сравнению с ИФН I типа иммуномодулирующей способностью, вовлекая различные клетки иммунной системы (НК, макрофаги, гранулоциты) в регуляцию гомеостаза организма как в норме, так и при повышенной функциональной нагрузке (заболевание, физическое и психо-эмоциональное напряжение, смена биоритмов).

Основные свойства ИФН связаны с их способностью оказывать опосредованное влияние на течение заболеваний различной этиологии (инфекционных, аллергических, онкологических, аутоиммунных), затрагивающих состояние иммунной системы, являясь важным звеном межклеточной кооперации посредством взаимодействия с различными цитокинами (ИЛ-2, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-18, ИЛ-15). Отмечается также как положительное, так и негативное воздействие ИФН на функциональную активность центральной нервной системы (ЦНС) [36].

Ведущая роль ИФН в поддержании противовирусной резистентности организма была установлена в середине прошлого века и доказана вначале экспериментальным путем на различных модельных системах с использованием нокаутных животных. При отсутствии в организме мышей рецепторов к ИФН $\alpha/\beta$  и ИФН $\gamma$  значительно возрастала их чувствительность к вирусной инфекции, а способность к выработке продуктивного ответа на большинство вирусов редуцировалась [37, 48]. Доказательное экспериментальное подтверждение прямой зависимости устойчивости организма к вирусным инфекциям от уровня функциональной активности ИФН дало основание для разработки и внедрения большого числа препаратов ИФН в клиническую практику, в первую очередь, как средств противовирусной защиты.



**Спектр и нозологическая направленность применения препаратов ИФН.** В настоящее время лекарственные формы на основе ИФН производятся десятком фармацевтических компаний: ЗАО «Вектор-Медика», ООО «Фармапарк», ЗАО «Биокад», ООО «Ферон», Россия; Шеринг Плау Лабо Н.В., Бельгия; Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд, Германия; ТЕВА Фармасьютикалз Индустрия Лтд, Израиль и др. Следует отметить, что все серии препаратов интерферона, поступающие в обращение на территории Российской Федерации, подлежат обязательной сертификации и проходят лабораторные испытания в аккредитованных лабораториях с целью подтверждения их соответствия требованиям нормативной документации. Показатели качества, содержащиеся в нормативной документации на препарат, обеспечивают его безопасность и клиническую эффективность [12]. Основным показателем качества, обеспечивающим клиническую эффективность препаратов интерферона, является специфическая фармакологическая активность. Метод определения специфической активности основан на способности интерферона защищать культуру клеток от цитопатического действия вируса-индикатора. Специфическая активность выражается в международных единицах (МЕ), рассчитанных по сравнению со стандартным образцом активности [1].

Наиболее широкое применение нашли лекарственные средства (ЛС), созданные методами генной инженерии (рекомбинантные ИФН) [4]. Медицинские препараты интерферона по составу делятся на  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  интерфероны и проявляют клинически доказанную эффективность при широком спектре заболеваний различного генеза. Все эти годы список фармакологических препаратов на основе ИФН возглавляет ИФН $\alpha$  (альгерон, альтевир, виферон, реаферон-ЕС, реаферон-ес-липид, реалдирон, роферон А, интрон А, пегинтрон, пегасис) [4]. Это ЛС, относящиеся к группе противовирусных средств и имеющие достаточно широкое клиническое применение во всем мире. Препараты ИФН $\beta$  (авонекс, бетаферон, генфаксон, инфибета, ребиф, ронбетал, синновекс) с успехом применяются для лечения рассеянного склероза [14], а ЛС на основе ИФН $\gamma$  (гаммаферон, ингарон) используются для терапии пациентов с хроническими заболеваниями различной этиологии, в патогенезе которых значительную роль играет выраженная дисфункция иммунной системы, таких как хронический гранулематоз [26], остеопороз [33], атопический дерматит [17], ревматоидный артрит, системная красная волчанка [9]. Показана также эффективность ЛС данной группы в лечении туберкулеза [40]. ЛС на основе ИФН $\lambda$  в настоящее время проходят клинические испытания как средства терапии вирусного гепатита С и всесторонне изучаются в качестве перспективных противоопухолевых препаратов [34].

**Опыт лечения препаратами интерферона альфа наиболее распространенных заболеваний вирусной этиологии.** Установлено, что основой клинического проявления любой вирусной инфекции, требующей коррекции препаратами ИФН, является иммунокомплексный, включающий снижение способности лейкоцитов к продукции ИФН $\alpha/\beta$  и ИФН $\gamma$  патогенетический механизм, приводящий к развитию вторичного интерферон- и иммунодефицита [5, 10, 11].

Среди интерферонов, наиболее изученным с точки зрения вирусной патологии, является ИФН $\alpha$ . Благодаря достижениям генетики, молекулярной биологии, иммунологии удалось детально изучить механизм его противовирусного эффекта, что легло в основу создания целого ряда противовирусных препаратов ИФН $\alpha$ : 2а и 2б. В табл. наглядно продемонстрирована их эффективность при ряде вирусных инфекций.

Среди представленных в табл. заболеваний наиболее распространенными

## Эффективность применения препаратов ИНФ $\alpha$ при основных вирусных инфекциях [4]

Нозологическая форма	Клинический эффект
Грипп и другие острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ)	Экстренная профилактика групп риска ингаляционной формой ИНФ $\alpha$ . Лечебный эффект при в/м введении детям раннего возраста с респираторно-синцитиальными инфекциями
Герпес гениталий	Заметное сокращение продолжительности рецидива, уменьшение боли, увеличение межрецидивных периодов у больных, получающих иммунодепрессанты на фоне интерферонотерапии
Генитальные бородавки и остроконечные кондиломы	Полное рассасывание бородавок через 6 — 10 недель после начала лечения более чем в 50% случаев. Эффект наиболее выражен у женщин
Кератиты и керато-конъюнктивиты герпес- и аденовирусной этиологии Опоясывающий лишай Вирусные гепатиты (острые и хронические формы гепатита В, С и D)	Снижение тяжести и сроков заболевания при местном назначении Увеличение межрецидивных периодов в 3 раза Выраженный клинический эффект. В тяжелых случаях уменьшение интенсивности и продолжительности интоксикации. Снижение смертности до 60%; исчезновение вирусных маркеров, нормализация сывороточных аминотрансфераз и трансаминаз
Папилломатоз гортани	После хирургического удаления папиллом хороший эффект (до 70% излечения) дает длительная интенсивная терапия до 1,5 лет
Папилломавирусные инфекции (папилломы конъюнктивы, мочевого пузыря, бородавки) Подострый склерозирующий панэнцефалит	Исчезновение папиллом при местном использовании Различная степень клинического улучшения состояния больных при введении в спинномозговой канал или желудочки мозга
СПИД	Нормализация иммунологических параметров, снижение остроты течения заболевания более чем в 50% случаев, исчезновение сывороточных маркеров (p24). Эффект в отношении саркомы Капоши достигает 32 — 50%. Показана комбинированная терапия с азидотимидином
Цитомегаловирусные инфекции при СПИД и после трансплантации почек или костного мозга	Профилактическое действие в отношении цитомегаловирусных пневмоний и гепатитов

и социально-значимыми инфекциями вирусной этиологии являются грипп и другие ОРВИ, герпетические поражения, вирусные гепатиты В и С (ВГВ, ВГС). Хронический ВГС отнесен к социально-значимым инфекционным заболеваниям России как доминирующий среди других форм ВГ, приводящих к развитию цирроза или гепатокарциномы и требующих превентивного лечения с целью подавления прогрессирования болезни [16].

**Грипп и ОРВИ.** Грипп и другие ОРВИ ежегодно поражают население Земли и составляют около 80% всей инфекционной заболеваемости, нанося значительный экономический урон обществу и здоровью населения. Несмотря на достижения в борьбе с гриппом, связанные с использованием вакцин, хи-

миопрепаратов, ИФН и их индукторов, иммуномодуляторов, совершенствованием методов лечения больных гриппом, особенно осложненным бактериальной инфекцией, грипп остается одной из важнейших проблем практического здравоохранения. Препараты ИФН $\alpha$ , сочетающие в себе свойства ингибитора вирусной продукции и повышения иммунной защиты организма [4, 11], в течение полувека успешно применяются как при сезонном гриппе, так и при пандемическом гриппе А. Под действием ИФН повышается эффективность иммунного распознавания антигена, усиливаются фагоцитарная и цитолитическая функции, направленные на элиминацию возбудителя или антигенно-измененных клеток, а также коррекция других вторичных иммунодефицитов, развивающихся вследствие патологического процесса. В экспериментах *in vivo* и *in vitro* было показано, что новый тип вируса свиного гриппа А(H1N1), вызвавший пандемию в 2009 г., и высокопатогенный вирус птичьего гриппа H5N1 оказались высокочувствительными к антивирусному действию ИФН( $\alpha/\beta$ ) [29, 39]. Профилактическое введение ИФН $\alpha$  в низких дозах (однократно или многократно) редуцировало репликацию как H1N1, так и H5N1 вируса и оказывало защитное действие на мышей при введении им летальной дозы вируса H5N1 [29]. Полученные экспериментальные данные могут быть использованы для разработки новых схем профилактики и комплексной терапии пандемического гриппа с применением имеющегося арсенала препаратов ИФН $\alpha$ .

Один из препаратов отечественной фарминдустрии — виферон (суппозитории ректальные на основе ИФН $\alpha$ -2b, 150 000 и 500 000 МЕ) широко используется в педиатрической практике для лечения ОРВИ у детей различного возраста, включая новорожденных [8]. Важно подчеркнуть, что интерферонотерапия может оказаться ценным дополнительным методом лечения осложненного гриппа на фоне развития резистентности вируса к известным противовирусным средствам — производным адамантана (римантадин, амантадин) и ингибиторам нейроминидазы (осельтамивир, занамивир).

**Герпесвирусная инфекция.** Герпес — одна из наиболее распространенных неконтролируемых инфекций человека. Вирусы простого герпеса (ВПГ1 и ВПГ2) могут циркулировать бессимптомно в организме практически здорового человека, но у людей с иммуносупрессией могут вызывать серьезный исход, вплоть до летального. Согласно данным сероэпидемиологических исследований, инфицирование вирусами ВПГ1 обнаруживается у 20 — 40%, а ВПГ2 — у 50 — 70% больных генитальным герпесом [13]. ВПГ1 и ВПГ2 вызывают разнообразные инфекционные заболевания, поражающие слизистые оболочки и кожные покровы, ЦНС, а иногда и внутренние органы. Попав в организм человека, ВПГ сохраняется в нем на протяжении всей жизни, периодически вызывая рецидивы заболевания различной степени тяжести. Неуклонный рост этого заболевания, приводящего к высоким перинатальным потерям и рождению детей с тяжелыми поражениями мозга, паренхиматозных органов и легких обуславливает необходимость всестороннего изучения герпетической инфекции и поиска эффективных методов профилактики и лечения.

В настоящее время около половины всех существующих противовирусных препаратов составляют именно антигерпетические средства [5], и значительная роль среди них отводится препаратам ИФН $\alpha$ . Доказано, что ИФН являются наиболее важными цитокинами при формировании противовирусного иммунного ответа при данной патологии. Защитный эффект ИФН при ВПГ-

инфекции проявляется уже на ранних этапах заболевания еще до образования антител и обусловлен как его прямой антивирусной, так и иммуномодулирующей активностью. ИФН замедляет развитие продуктивной инфекции, ингибируя, по-видимому, высвобождение вируса из инфицированной клетки. Коррекция ИФН статуса в динамике при использовании препаратов (ИФН, индукторов ИФН, иммуномодуляторов) может служить критерием эффективности проводимой терапии у больных [10, 11]. Назначение препаратов ИФН для лечения рецидивирующего герпеса приводит к заметному положительному эффекту — уменьшению выраженности клинических проявлений во время рецидива и ускорению реэпителизации. Доказано, что под их влиянием отмечается значительное усиление иммунного ответа, приводящее к более быстрому купированию рецидива и удлинению межрецидивных периодов [15].

**Вирусные гепатиты.** Гепатиты В, С и D занимают значительную часть среди парентеральных инфекционных заболеваний вирусной этиологии. Согласно данным ВОЗ, представленным в 2015 г., порядка 2 млрд человек инфицированы ВГВ, при этом 350 млн из них имеют хроническую форму заболевания. Ежегодно от 0,5 до 1 млн больных умирают от гепатоцеллюлярной карциномы и других серьезных патологий печени, ассоциированных с ВГВ [27, 43]. Среди 8 известных генотипов вируса ГВ, обозначенных буквами латинского алфавита от А до Н, в Российской Федерации заметно превалирует ВГВ с генотипом D, выявляющийся у 93% больных [23].

Показатель распространенности ВГС в мире в настоящее время составляет 3%, а хроническим ВГС страдает около 170 млн человек [49]. По оценкам ВОЗ, количество инфицированных ВГС продолжает увеличиваться на 3 — 4 млн человек каждый год [43]. Среди идентифицированных шести генотипов ВГС в России чаще всего регистрируются ВГС 1b, выявляющийся примерно в половине случаев, далее с убывающей частотой следуют 3a (30 — 40% случаев), затем 1a и 2a [16]. У 15 — 45% инфицированных ВГС наблюдается спонтанное исчезновение вируса в течение 6 месяцев после заражения, однако у остальных 55 — 85% течение гепатита принимает хроническую форму, выраженность которой варьирует от бессимптомного течения до развития таких серьезных заболеваний печени, как цирроз и первичный рак [49].

ВГD, являющийся уникальным РНК-содержащим патогеном, проявляет свою вирулентность только при наличии поверхностного антигена ВГВ (HbsAg), циркулирующего в крови пациентов с острым или хроническим ВГВ. По существующим оценкам, на сегодняшний день 15 — 20 млн человек в мире являются носителями как ВГВ, так и ВГD [19]. Клинические наблюдения показали, что у пациентов с ВГВ/ВГD риск развития супер-инфекции с высокой вероятностью неблагоприятного разрешения достаточно велик.

Хронические вирусные гепатиты В и С сопровождаются развитием дефицита системы ИФН, характеризующимся подавлением способности лимфоцитов к продукции ИФН $\alpha$  и ИФН $\gamma$  [4]. Поэтому эффективность применения препаратов ИФН при этих заболеваниях обусловлена не только их противовирусным, но и, что особенно важно, иммуномодулирующим действием на сопутствующее иммунодефицитное состояние.

Предрасполагающим фактором для формирования терапевтической ИФН-чувствительности больных как ВГВ, так и ВГС является генетический вариант вируса. Наибольшая резистентность к ИФН терапии отмечается у больных, инфицированных ВГВ генотипа D [23] и ВГС 1b типа. Немаловаж-

ную роль в достижении положительного эффекта при ИФН терапии играет и фактор наследственности больного. Так, установлено, что особенности формирования противовирусного ответа у пациентов с ВГС связаны с полиморфизмом гена IL28B, встречающегося в 3 вариантах — СС, СТ и ТТ. У пациентов с СС генотипом IL28B частота быстрого вирусологического ответа и частота устойчивости вирусологического ответа (УВО) — неопределяемый уровень РНК ВГС через 6 месяцев после завершения терапии — в 2 — 3 раза выше, чем у пациентов с СТ и ТТ [2].

В настоящее время основным этиологическим средством терапии вирусных гепатитов С, дающим клинически значимые результаты, остается так называемый «международный золотой стандарт» — сочетанное применение инъекционной формы препаратов ИФН $\alpha$  (интрон А, роферон А, пегинтрон, пегасис подкожно) и рибавирина (ежедневно, в форме таблеток). Оптимальный ответ на комбинированную терапию в течение 6 месяцев достигается у 40 — 50% пациентов, инфицированных ВГС 1b генотипа [22] и у 70 — 80% больных, инфицированных ВГС с генотипом 2 или 3 [25].

Поиск новых биологически активных соединений одновременно с изучением природы вируса гепатита С привело к созданию препаратов, оказывающих прямое ингибирующее действие на различные фазы жизненного цикла вируса. К 2015 г. Управлением США по надзору за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств уже одобрены к применению 3 прямых ингибитора вирусных протеаз — телапревир, боцепревир, семипревир и один NS5B ингибитор полимеразы — софосбувир [21] в качестве дополнительного компонента комплексного лечения пациентов с ВГС генотипа 1b. Телапревир зарегистрирован также и в России. Стойкий противовирусный эффект при применении предложенных средств в комбинации с пегилированным ИФН $\alpha$  и рибавирином отмечается в 80 — 89% случаев при лечении больных с ВГС 1b типа и в 83 — 100% случаев при лечении пациентов, инфицированных ВГС 2 или 3 типа, при этом срок лечения сокращается до 12 недель [18].

Несмотря на значительные успехи в профилактике ВГВ благодаря вакцинации населения, до сих пор значительное количество больных с хронической формой ВГВ нуждаются в терапии. Лечение данного заболевания на текущий момент основано на применении двух классов соединений — препаратов ИФН $\alpha$  и пяти аналогов нуклеозидов и нуклеотидов как в виде моно-, так и в виде комплексной терапии. Стандартная ИФН монотерапия проводится в течение 48 — 52 недель, при этом предпочтение отдается инъекционным пегилированным формам ИФН $\alpha$  — ПегИФН $\alpha$ -2 $\alpha$  и ПегИФН $\alpha$ -2b (ежедневно однократно, подкожно), демонстрирующим сходную эффективность и позволяющим добиться положительного результата в 20 — 30% случаев [42]. Аналоги нуклеозидов (ламивудин, телбивудин, энтекавир) и нуклеотидов (адефовир, тенофовир), являющиеся ингибиторами ДНК полимеразы ВГВ, превосходят по эффективности препараты ИФН, однако для достижения устойчивости вирусологического ответа требуется длительная поддерживающая монотерапия в течение нескольких лет, во время которой отмечается накопление резистентных мутаций вируса и появление терапевтически устойчивой реинфекции [27]. Выбор комбинированной терапии аналогами нуклеозидов/нуклеотидов с препаратами ИФН $\alpha$ , оказывающих комплексное воздействие на иммунную систему, позволяет не только сократить длительность применения аналогов нуклеозидов/нуклеотидов, но и увеличить кли-

ническую эффективность. Так, при комбинированной терапии пациентов с ВГВ генотипа D, преобладающим в РФ, у 37% больных удалось добиться положительного результата, тогда как при монотерапии ИФН или ламивудином аналогичный результат наблюдался только в 16,3 и 11,0% случаев соответственно [7]. Следует отметить, что ламивудин, являющийся относительно недорогим противовирусным препаратом первого поколения, значительно чаще других аналогов нуклеозидов/нуклеотидов ассоциирован с развитием резистентности к терапии уже через год применения. Наиболее интересны с этой точки зрения препараты нового поколения — энтекавир и тенофовир, сочетающие в себе высокую эффективность по всем основным показателям и наиболее низкую частоту возникновения резистентности [27]. Именно эти ЛС рассматриваются в настоящее время как наиболее перспективные кандидаты для комбинированной терапии препаратами ИФН $\alpha$ , и разрабатываются наиболее оптимальные схемы их совместного клинического применения [51].

В отличие от препаратов для ВГС и ВГВ, до сих пор отсутствуют новые эффективные лекарственные средства прямого действия для лечения пациентов, инфицированных вирусом гепатита D, при котором препараты ИФН $\alpha$  остаются единственным средством этиотропной терапии. Использование препаратов ИФН $\alpha$  (3 — 9 млн МЕ в течение 3 — 24 месяцев) при лечении латентной инфекции ВГД показало, что биохимический и вирусологический ответ достигается у 70% пациентов с хроническим ВГД к концу терапии. Однако устойчивый вирусологический ответ отмечается в среднем только у 25 — 28% больных [6, 50], что указывает на необходимость разработки как новых схем лечения на основе имеющегося потенциала, так и создания новых фармакологических средств этиотропной терапии ВГД.

В процессе проведения лечения ВГ препаратами ИФН в обязательном порядке должен проводиться постоянный мониторинг вирусологических, биохимических и гематологических показателей. Для прогноза эффективности терапии рекомендуется во время лечения проводить также мониторинг параметров ИФН статуса. Текущая оценка эффективности терапии и выраженности побочных эффектов, а также своевременное выявление индуцированных или спонтанных резистентных мутаций вируса [18] позволит вовремя скорректировать схему лечения. Положительные сдвиги биохимических показателей, достижение устойчивого вирусологического ответа, исчезновение специфического маркера — HbsAg, уменьшение цитолитического процесса в печени, тенденция к нормализации показателей ИФН и иммунной системы указывают на эффективность противовирусной ИФН терапии при ВГ.

**Побочные эффекты интерферонотерапии.** Необходимо отметить, что при длительном, многомесечном применении препаратов ИФН в процессе лечения ВГ, а также некоторых других заболеваний (онкология, рассеянный склероз и др.) развивается ряд побочных эффектов, затрагивающих в той или иной степени практически все жизненно важные органы и системы, а также возможное образование антител, частично нейтрализующих действие самих препаратов [14]. В 10 — 15% случаев тяжелые осложнения приводят к прерыванию терапии [31]. Наиболее часто при комбинированном применении препаратов ИФН $\alpha$  и рибавирина отмечается развитие острых осложнений в виде гриппоподобного состояния (более 90% случаев), проявляющегося в апатии, миалгии, повышении температуры тела, усталости [22, 46]. Описанные выше синдромы

достаточно легко устранимы в течение нескольких дней и не связаны с прерыванием лечения.

Преобладающим хроническим осложнением, ведущим к редукции доз рибавирина и/или ингибитора прямого действия при двойной (пегИФН $\alpha$ +рибавирин) и тройной (пегИФН $\alpha$ +рибавирин+телапревир/боцепревир) терапии является цитопения, в частности, анемия, которая развивается вследствие угнетения костно-мозгового кроветворения и индукции гемолиза в 29 и 49% случаев при двойной и тройной терапии соответственно. В 16% случаев при ИФН терапии отмечается развитие депрессивного синдрома, сопровождающегося суицидальными намерениями у 4 — 6% пациентов, что требует немедленного прекращения терапии и помощи психиатра. В некоторых случаях ИФН терапия является провоцирующим фактором для развития аутоиммунных нарушений различной степени выраженности — от появления аутоиммунных антител в крови пациентов до отчетливых клинических проявлений таких заболеваний, как ревматоидный артрит, полимиозит и системная красная волчанка [30]. Развитие дисфункции щитовидной железы во время антивирусной терапии или непосредственно после нее затрагивает в среднем 5% пациентов [22], однако этот показатель варьирует в широких пределах и связан, по-видимому, с генетической предрасположенностью. Так, отмечается достаточно высокий риск развития аутоиммунных тиреоидитов у жителей кавказского региона и Японии (25 и 31% соответственно), у которых, кроме того, в процессе проведения стандартной двойной ИФН терапии практически во всех случаях развивается аутоиммунный хронический сахарный диабет I типа [52]. Влияние наследственности и факторов окружающей среды на генерализацию различных аутоиммунных нарушений после завершения ИФН терапии отмечается и другими авторами [38].

Из иных достаточно часто встречающихся побочных эффектов следует отметить развитие различных обратимых дерматологических нарушений — аллопеции, кожного зуда, уртикарий, экзематозной сыпи и др. [22], а также снижение веса, миалгии и артралгии. Случаи кардиотоксического действия препаратов ИФН $\alpha$ , проявляющиеся в развитии аритмии и застойной сердечной недостаточности, достаточно редки, однако требуют немедленного прекращения терапии [46].

В целом, положительный эффект при длительном применении препаратов ИФН в высоких дозах, при ряде вирусных инфекций остающихся единственной основой эффективной противовирусной терапии, значительно преобладает над отдельными нежелательными симптомами, имеющими в большинстве случаев обратимый характер.

**Перспективы терапевтического применения интерферонов.** В настоящее время в медицинской практике эффективно используются препараты ИФН в виде растворов для инъекций, мазей, гелей, суппозиториев, капель в нос. При этом спектр новых лекарственных форм ИФН постоянно расширяется, предлагаются новые варианты создания рекомбинантных молекул ИФН и новые схемы его клинического применения. Так, разработана пероральная лекарственная форма рекомбинантного ИФН $\alpha$  (липосомальный отечественный препарат реаферон-ЕС-липинт), позволившая обеспечить эффективность ЛС не только депонированием ИФН в организме с последующим замедленным, регулируемым высвобождением, но и его направленным транспортом к органу-мишени.

Основная задача разработчиков новых ЛС на основе ИФН, имеющих раз-

личную нозологическую направленность, состоит в снижении системных токсических эффектов и увеличении клинической эффективности. Дальнейший прогресс при создании новых препаратов в основном связан с применением методов молекулярной биологии и биотехнологии. Исследования, проводимые в этом направлении на базе новейших биотехнологий, открывают новые возможности для создания на основе интерферонов I типа эффективных и относительно безопасных лекарственных средств лечения онкологических больных.

Так, созданный методами генной инженерии вектор на базе аденоассоциированного вируса, кодирующий ИФН $\alpha$  и сцепленный с аполипопротеином А1, продемонстрировал хороший терапевтический потенциал при его комбинированном использовании с энтекавиром на моделях хронического ВГ у хомячков [20].

Недавно показана высокая эффективность применения ИФН $\alpha$ , связанного с антителами к различным маркерам опухолевых или иммунокомпетентных клеток-мишеней [47], что является основой для разработки новых лекарственных препаратов для иммунотерапии опухолей различного генеза.

Особый интерес вызывает инновационная концепция создания мутантных рекомбинантных молекул ИФН I типа, связанных со специфическими антителами. Такие соединения позволяют снижать системные токсические эффекты ИФН, сохраняя при этом специфическое фармакологическое действие в отношении клеток-мишеней [47].

В экспериментах *in vivo* и *in vitro* было продемонстрировано, что такой ИФН комплекс, содержащий мутантный ИФН $\alpha$ 2 и использующий специфическое антитело как способ доставки к клеткам-мишеням, в 1000 раз усиливает специфическую активность ИФН, причем 90 % активности приходится именно на клетки-мишени [28].

Современные препараты ИФН $\alpha$  уже давно используют для лечения вирусных инфекций. Полиэтиологическая направленность противовирусного, иммуномодулирующего и антипролиферативного действия ИФН позволяет рассматривать их как перспективные средства для лечения не только вирусных заболеваний, но и ряда других форм соматической патологии (бактериальные, аутоиммунные, онкологические и др. заболевания). Это значительно расширяет область дальнейшего клинического использования рассмотренных выше препаратов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Волкова Р.А., Фадейкина О.В., Борисевич И.В., Мовсесянц А.А., Бондарев В.П. Оценка состояния проблемы аттестации и применения отраслевых стандартных образцов медицинских иммунобиологических препаратов. Стандартные образцы. 2013, 3: 58-61.
2. Громова Н.И. Применение принципов персонализированной медицины в лечении больных вирусными гепатитами. В мире вирусных гепатитов. 2014, 1: 14-19.
3. Ершов Ф.И. Система интерферона в норме и при патологии. М.: Медицина, 1996.
4. Ершов Ф.И. Антивирусные препараты. М.: Гэотар-Медиа, 2006.
5. Ершов Ф.И., Оспельникова Т.П. Современный арсенал антигерпетических лекарственных средств. Инфекции и антимикробная терапия. 2001, 3 (4): 100-104.
6. Ильченко Л.Ю., Кожанова Т.В., Морозов И.А., Федоров И.Г., Миронова Н.И. Цирроз печени в исходе латентной дельта-инфекции. В мире вирусных гепатитов. 2014, 1: 38-46.
7. Нурмухаметова Е.А., Блохина Н.П. Генотипы вируса гепатита В: потенциальное клиническое значение. Фарматека. 2008, 2: 33-35.



8. Околышева Н.В., Кистенева Л.Б., Выжлова Е.Н., Малиновская В.В., Чешик С.Г., Парфенов В.В., Ружицкая Е.А., Семенов А.В., Фисенко А.П. Эффективность виферонотерапии у детей раннего возраста с острой респираторной вирусной инфекцией. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2015, 2: 78-86.
9. Оспельникова Т.П., Егорова О.Н., Балабанова Р.М., Козина В.И., Ершов Ф.И. Интерферон и другие цитокины при ревматических заболеваниях. *Вестник РАМН*. 2010, 7: 3-7.
10. Оспельникова Т.П. Выявление и коррекция интерферондефицита при воспалительных гинекологических заболеваниях. *Georgian Medical News*. 2012, 11 (212): 24-32.
11. Оспельникова Т.П. Роль интерферона при гриппе и генитальном герпесе. *Вопросы вирусологии*. 2013, 5: 4-10.
12. Постановление правительства РФ от 01.12.2009 № 982 (ред. от 20.10.2014) «Об утверждении единого перечня продукции, подлежащей обязательной сертификации, и единого перечня продукции, подтверждение соответствия которой осуществляется в форме принятия декларации о соответствии».
13. Семенова Т.Б. Принципы лечения простого герпеса. *Русский медицинский журнал*. 2002, 10, 20 (164): 924-930.
14. Хабиров Ф.А., Хайбуллин Т.И., Бабичева Н.Н., Аверьянова Л.А., Гранатов Е.В., Оспельникова Т.П. Долгосрочная эффективность и переносимость отечественного биоаналога интерферона бета-1b для лечения рассеянного склероза. *Практическая медицина*. 2013, 1-1 (68): 202-204.
15. Халдин А.А., Полеско И.В., Малиновская В.В. Клинико-патогенетическое обоснование применения рекомбинантного интерферона  $\alpha 2b$  с антиоксидантами (витамины Е и С), суппозитории ректальные в терапии рецидивирующего простого герпеса. *Лечащий врач*. 2015, 11: 12-15.
16. Эсауленко Е.В. Гепатит С: взгляд на проблему. *В мире вирусных гепатитов*. 2013, 4: 14-19.
17. Akhavan A., Rudikoff D. Atopic dermatitis: systemic immunosuppressive therapy. *Semin Cutan. Med. Surg.* 2008, 27 (2): 151-155.
18. Alexopoulou A., Karayiannis P. Interferon-based combination treatment for chronic hepatitis C in the era of direct acting antivirals. *Ann. Gastroenterol.* 2015, 28 (1): 55-65.
19. Alfaiate D., Dény P., Durantel D. Hepatitis delta virus: From biological and medical aspects to current and investigational therapeutic options. *Antiviral Res.* 2015, 122: 112-129.
20. Berraondo P., Di Scala M., Korolowicz K. et al. Liver-directed gene therapy of chronic hepatitis B infection using interferon alpha tethered to apolipoprotein A-I. *J. Hepatol.* 2015, 63 (2): 329-336.
21. Brochet E., Helle F., Castelain S. et al. Which therapeutic option for hepatitis C virus genotype 1? *Scand. J. Gastroenterol.* 2015, 50 (4): 470-823.
22. Chopra A., Klein P.L., Drinnan T., Lee S.S. How to optimize HCV therapy in genotype 1 patients: management of side-effects. *Liver Int.* 2013, 33 (1): 30-34.
23. Croagh C.M., Desmond P.V., Bell S.J. Genotypes and viral variants in chronic hepatitis B: A review of epidemiology and clinical relevance. *World J. Hepatol.* 2015, 7 (3): 289-303.
24. Donnelly R.P., Kottenko S.V. Interferon-lambda: a new addition to an old family. *J. Interferon Cytokine Res.* 2010, 30 (8): 555-564.
25. Dore G.J., Lawitz E., Hézode C., Shafraan S.D. et al. Daclatasvir plus peginterferon and ribavirin is noninferior to peginterferon and ribavirin alone, and reduces the duration of treatment for HCV genotype 2 or 3 infection. *Gastroenterology*. 2015, 148 (2): 355-366.
26. Errante P.R., Frazro J.B., Condino-Neto A. The use of interferon-gamma therapy in chronic granulomatous disease. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.* 2008, 3 (3): 225-230.
27. European association for the study of the liver. EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 2012, 57: 167-185.
28. Garcin G., Paul F., Staufienbiel M. et al. High efficiency cell-specific targeting of cytokine activity. *Nat. Commun.* 2014, 5: 3016.
29. Haasbach E., Droebner K., Vogel A.B., Planz O. Low-dose interferon type I treatment is effective against H5N1 and swine-origin H1N1 influenza A viruses in vitro and in vivo. *J. Interferon Cytokine Res.* 2011, 31 (6): 515-525.
30. Hall J.C., Rosen A. Type I interferons: crucial participants in disease amplification in autoimmunity. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2010, 6 (1): 40-49.
31. Hunyady B., Kovács B., Battyáni Z. Side-effects of pegylated interferon plus ribavirin therapy

- with or without protease inhibitor direct acting antiviral agents during treatment of chronic hepatitis C virus infection. *Orv. Hetil.* 2011, 152 (50): 1997-2009.
32. Iikura K., Katsunuma T., Saika S. et al. Peripheral blood mononuclear cells from patients with bronchial asthma show impaired innate immune responses to rhinovirus in vitro. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2011, 155 (1): 27-33.
  33. Key L.L., Ries W.L., Rodriguiz R.M., Hatcher H.C. Recombinant human interferon gamma therapy for osteopetrosis. *J. Pediatr.* 1992, 121 (1): 119-124.
  34. Lasfar A., Zloza A., Cohen-Solal K.A. IFN-lambda therapy: current status and future perspectives. *Drug Discov. Today.* 2015, Nov. 10. pii: S1359-6446(15)00419-5. doi: 10.1016/j.drudis.2015.10.021.
  35. Li J., Ye L., Wang X. et al. Induction of interferon- $\lambda$  contributes to toll-like receptor 3-mediated herpes simplex virus type 1 inhibition in astrocytes. *J. Neurosci Res.* 2012, 90 (2): 399-406.
  36. Nallar S.C., Kalvakolanu D.V. Interferons, signal transduction pathways, and the central nervous system. *J. Int. Cytokine Research.* 2014, 34 (8): 559-576.
  37. Nunez R. Revision of the functional analysis and structural features of immortalized dendritic cell lines derived from mice lacking both type I and type II interferon receptors. *Immunology Letters.* 1999, 68: 173-186.
  38. Okanoue T., Sakamoto S., Itoh Y. et al. Side effects of high-dose interferon therapy for chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* 1996, 25: 283-291.
  39. Osterlund P., Pirhonen J., Ikonen N. et al. Pandemic H1N1 2009 influenza A virus induces weak cytokine responses in human macrophages and dendritic cells and is highly sensitive to the antiviral actions of interferons. *J. Virol.* 2010, 84 (3): 1414-1422
  40. Reljic R. IFN-gamma therapy of tuberculosis and related infections. *J. Interferon Cytokine Res.* 2007, 27 (5):353-364.
  41. Samuel C.E. Antiviral actions of interferons. *Clinical Microbiology Reviews.* 2001, 14 (4): 778-809.
  42. Santantonio T.A., Fasano M. Chronic hepatitis B: Advances in treatment. *World J. Hepatol.* 2014, 6 (5): 284-292. doi: 10.4254/wjh.v6.i5.284.
  43. Stasi C., Silvestri C., Voller F., Cipriani F. The epidemiological changes of HCV and HBV infections in the era of new antiviral therapies and the anti-HBV vaccine. *J. Infect. Public Health.* 2015 Jul. 3. pii: S1876-0341(15)00101-X. doi: 10.1016/j.jiph.2015.05.004.
  44. Stiff A., Carson I. W. Investigations of interferon-lambda for the treatment of cancer. *J. Innate Immun.* 2015, 7 (3): 243-250.
  45. Swiecki M., Colonna M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nature Reviews Immunology.* 2015, 15: 471-485.
  46. Talpaz M., Hehlmann R., Quintars-Cardama A. et al. Re-emergence of interferon- $\alpha$  in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2013, 27: 803-812.
  47. Uzé G., Tavernier J. High efficiency targeting of IFN- $\alpha$  activity: Possible applications in fighting tumours and infections. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015, 26 (2):179-182.
  48. Van den Brock., Muller M.F.U., Huang S. et al. Antiviral defense in mice lacking both alpha/beta and gamma interferon receptors. *J. Virology.* 1995, 69: 4792-4796.
  49. WHO. Hepatitis C. Factsheet No 164 (цит. апрель 2014). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>.
  50. Yurdaydin C. Treatment of chronic deltahepatitis. *Semin Liver Dis.* 2012; 32 (3): 237-244.
  51. Yin G.Q., Zhong B. Efficacy of interferon for chronic hepatitis B in patients with nucleoside and nucleotide combination therapy failure. *J. Gastroenterol Hepatol.* 2015, Oct. 12. doi: 10.1111/jgh.13191.
  52. Zornitzki T., Malnick S., Lysy L., Knobler H. Interferon therapy in hepatitis C leading to chronic type 1 diabetes. *World J. Gastroenterol.* 2015, 21 (1): 233-239.

*Поступила 26.02.16*

Контактная информация: Оспельникова Татьяна Петровна, к.м.н.,  
123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

## В ПОМОЩЬ ПРЕПОДАВАТЕЛЮ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*Н.И.Брико, А.Я.Миндлина, Р.В.Полибин*

### **СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ КАДРОВОГО ПОТЕНЦИАЛА ПРОФЕССОРСКО-ПРЕПОДАВАТЕЛЬСКОГО СОСТАВА В ОБЛАСТИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ**

Первый московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова

*N.I.Briko, A.Ya.Mindlina, R.V.Polibin*

### **THE STATE AND PROSPECTS OF DEVELOPMENT OF PERSONNEL POTENTIAL FACULTY IN EPIDEMIOLOGY**

Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

Журн. микробиол., 2016, № 5, С. 122—126 (Zh. Mikrobiol., Moscow, 2016, No. 5, P. 122—126)

Сохранение здоровья населения, профилактика заболеваний и обеспечение биобезопасности страны является глобальной стратегической задачей, которая стоит перед здравоохранением Российской Федерации.

Для решения этих вопросов необходимо глубокое знание основной профилактической дисциплины здравоохранения — эпидемиологии, так как разработка профилактических программ является задачей эпидемиологии, а достигнуть надлежащей эффективности профилактических мероприятий невозможно без полноценного эпидемиологического обоснования.

Глобализация и интеграционные процессы в науке в последние годы определили качественно новый уровень развития эпидемиологии и расширение ее границ. Последние десятилетия ознаменовались существенным развитием науки эпидемиологии и увеличением ее роли в структуре современного здравоохранения.

В настоящее время эпидемиология рассматривается как фундаментальная медицинская наука, относящаяся к области профилактической медицины. Эпидемиология инфекционных и неинфекционных болезней представляют собой два раздела единой науки. Они идентичны по своей сути, имеют общий предмет изучения — заболеваемость (популяционный уровень организации патологии), единый научный метод (эпидемиологический) и общую цель — профилактику заболеваемости.

Ведущими специалистами в области профилактической медицины эпидемиологические исследования рассматриваются как основной инструмент системы здравоохранения, позволяющий выявлять и находить решения проблем здоровья современного общества, а эпидемиология справедливо считается диагностической дисциплиной современной медицины.

Специалисты эпидемиологи сегодня востребованы как в органах и учреждениях Роспотребнадзора, так и Министерства здравоохранения РФ. При этом как по штатному расписанию, так и по количеству физических лиц эпидемиологов в 2 раза больше в системе Минздрава России. Однако как в медицинских организациях Минздрава России, так и в системе Роспотребнадзора наблюдается значительная нехватка эпидемиологов.

Положительным прогностическим признаком улучшения ситуации с обеспеченностью кадрами в области эпидемиологии является существенный рост популярности этой специальности среди выпускников медико-профилактического факультета. В 2015 г. конкурс среди поступающих в интернатуру по эпидемиологии в Первый МГМУ им. И.М.Сеченова составил 5 человек на 1 место. В 2016 году планируют выбрать специальность «эпидемиология» 60% выпускников медико-профилактического факультета.

Появление новых научных данных и потребности практического здравоохранения сегодняшнего дня создали предпосылки для изменения парадигмы преподавания эпидемиологии. Содержание современной эпидемиологии и ее структура существенно отличаются от эпидемиологии XX века. Современная структура эпидемиологии включает в себя следующие модули, которые должны входить в обязательную программу обучения студентов по всем специальностям группы «здравоохранение»: общая эпидемиология с основами доказательной медицины; эпидемиология инфекционных болезней; госпитальная эпидемиология; военная эпидемиология и эпидемиология чрезвычайных ситуаций; эпидемиология неинфекционных болезней; клиническая эпидемиология. Естественно, что содержание и акценты в обучении врачей клиницистов и эпидемиологов должны различаться в зависимости от профессиональных компетенций специалиста. Вместе с тем, знание вопросов эпидемиологии в равной степени необходимо как для врачей эпидемиологов, так и для клиницистов.

В последнее время существенно расширился спектр направлений профессиональной деятельности в области эпидемиологии и имеются значительные различия в ее содержании в зависимости от места будущей работы эпидемиологов.

В связи с этим, подготовка эпидемиологов должна быть ориентирована на формирование профессиональных компетенций специалиста, необходимых в будущей профессиональной деятельности как в органах и учреждениях Роспотребнадзора, так и в медицинских организациях, эпидемиологических отделах и отделах иммунопрофилактики министерств и департаментов здравоохранения, научно-исследовательских институтах эпидемиологического профиля, эпидемиологических отделах и специализированных центрах, осуществляющих работу по профилактике неинфекционных болезней, центрах здоровья и др.

Увеличилось понимание значимости эпидемиологии в медицинском образовании. Расширился спектр специальностей, для которых дисциплина «эпидемиология» стала обязательной.

Однако для реализации современной парадигмы подготовки по эпи-

демиологии необходим квалифицированный кадровый потенциал профессорско-преподавательского состава.

Для изучения состояния кадрового потенциала кафедр и курсов эпидемиологии нами были разосланы анкеты в медицинские Вузы России. Анализ состояния кадрового потенциала проведен по 48 медицинским Вузам РФ.

Проведенный анализ показал, что при наличии квалифицированного профессорско-преподавательского состава имеются определенные проблемы, и кадровый потенциал профессорско-преподавательского состава в области эпидемиологии требует развития.

Основной проблемой является отсутствие кафедр эпидемиологии, а во многих Вузах и преподавателей эпидемиологии. В этом вопросе наша страна находится не в выгодных условиях по сравнению со многими другими странами. Во всех медицинских университетах Европы созданы отдельные кафедры эпидемиологии, в то время как в нашей стране кафедры эпидемиологии традиционно имеются только в Вузах, где есть медико-профилактические факультеты. При этом наблюдается тенденция объединения их с другими кафедрами даже при наличии медико-профилактических факультетов.

Всего в 33% медицинских Вузов России имеются самостоятельные кафедры эпидемиологии; 16 кафедр эпидемиологии на всю Россию явно недостаточно как для обеспечения потребности в эпидемиологах, так и для формирования компетенции в области эпидемиологии у врачей клиницистов. За последние 10 лет была организована лишь одна новая кафедра эпидемиологии в ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России.

Большие сложности с кадровым составом в Вузах, в которых отсутствуют медико-профилактические факультеты. При отсутствии самостоятельных кафедр эпидемиологии изучение дисциплины «эпидемиология» чаще всего осуществляется на кафедрах инфекционных болезней, реже на кафедрах гигиены, общественного здоровья, микробиологии и даже педиатрии. В 32 Вузах присутствуют кафедры, номинально совмещенные с курсами эпидемиологии. Они имеют различные названия: кафедра инфекционных болезней и эпидемиологии, кафедра гигиены и эпидемиологии, кафедра общественного здоровья и эпидемиологии, кафедра микробиологии и эпидемиологии и др.

При этом из 32 Вузов только в 20 есть преподаватели, специализирующиеся на преподавании эпидемиологии. Соответственно в 12 Вузах эпидемиологию преподают специалисты других специальностей.

На кафедрах инфекционных болезней и других клинических кафедрах преподаватели зачастую не имеют базовой специальности по диплому «медико-профилактическое дело», сертификата врача-эпидемиолога или ученой степени по специальности «эпидемиология». В связи с чем, они испытывают большие сложности в связи с изменением содержания и структуры эпидемиологии. В настоящее время назрела необходимость подготовки преподавателей клиницистов по вопросам современной эпидемиологии.

Существует также проблема соответствия занимаемой должности преподавателей эпидемиологии, не имеющих образования по специальности «медико-профилактическое дело», не имеющих сертификата специалиста-эпидемиолога или ученой степени по специальности «эпидемиология».

Общая тенденция сокращения ставок профессорско-преподавательского состава коснулась и преподавателей по эпидемиологии. Число ставок и физических лиц профессорско-преподавательского состава, их занимающих, за последние 7 лет существенно сократилось. В настоящее время в 48 медицинских Вузах по штатному расписанию предусмотрено всего 204,6 ставок, которые занимают 227 преподавателей.

При проведении подобного исследования в 2009 г. в 38 ВУЗах было 282,2 ставки, которые были заняты 302 физическими лицами.

Также изменилось соотношение штатных и внештатных сотрудников, увеличилось число совместителей по отношению к штатным преподавателям (70% штатных и 30% внештатных, в 2009 г. 83,8% и 16,2% соответственно).

Количество преподавателей на самостоятельных кафедрах эпидемиологии варьирует от 5 (Башкирский ГМУ, Иркутский ГМУ, Алтайский ГМУ) до 26 (Северо-Западный ГМУ).

На совмещенных кафедрах чаще всего имеется 1 — 2 преподавателя эпидемиологии (СВФУ, Южно-Уральский ГМУ, Ярославский ГМУ, ДВГМУ, МГУ им. Огарева, Тюменский ГМУ).

В течение последних 7 лет изменился возрастной состав преподавателей в сторону увеличения возраста: в 2009 г.: 26,1% в возрасте до 35 лет, 24,6% — 36 — 45 лет, 28,1% — 46 — 59 лет, 21,2% — старше 60 лет; 2015 г.: 16,3%, 25,1%, 33,5%, 25,1% соответственно.

В 2015 г. по сравнению с 2009 г. уменьшилось количество молодых преподавателей (до 35 лет): в 27 ВУЗах вообще отсутствуют молодые преподаватели, в 12 Вузах по 1 преподавателю, в 4 — 2, в 3 — 3 и только в двух ВУЗах имеется 4 молодых преподавателя.

Позитивным моментом является повышение количества преподавателей, имеющих ученые степени к.м.н. с 58,6% (2009 г.) до 63,9% (2015 г.) и д.м.н. с 18,2% (2009 г.) до 23,8% (2015 г.). Ученое звание профессора имеют 13,2%, а доцента — 28,6% преподавателей.

В структуре занимаемых должностей преобладают доценты (42,7%), профессоров — 13,1%, что свидетельствует о высоком профессионализме, доля ассистентов составляет 31,8% и 8,5% — старших преподавателей.

Таким образом, существует общая проблема всех медицинских ВУЗов, связанная с сокращением кадров профессорско-преподавательского состава высшей школы, что также коснулось и кафедр, и курсов эпидемиологии.

В то же время, при наличии достаточно квалифицированного профессорско-преподавательского состава кафедр и курсов эпидемиологии имеются определенные проблемы, требующие решения, на которые ректорам медицинских ВУЗов следует обратить внимание. Необходимо организовать во всех медицинских ВУЗах отдельные кафедры или курсы эпидемиологии, на которых должны работать преподаватели, имеющие базовую специаль-

ность по диплому «медико-профилактическое дело», сертификат врача-эпидемиолога или ученую степень по специальности «эпидемиология». При этом, следует обратить внимание на необходимость привлечения молодых преподавателей.

Кроме того, в связи с изменившейся структурой эпидемиологии необходима организация регулярно проводимых циклов повышения квалификации преподавателей эпидемиологии.

С 2014 года на кафедре эпидемиологии и доказательной медицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова проводятся курсы повышения квалификации по теме «Общая эпидемиология с основами доказательной медицины и психолого-педагогические основы профессиональной деятельности преподавателя медицинского ВУЗа» с элементами дистанционного обучения в объеме 72 часов для преподавателей медицинских ВУЗов России и стран ближнего зарубежья. За прошедшее время повышение квалификации на кафедре прошли 18 преподавателей эпидемиологии из различных Вузов нашей страны и стран ближнего зарубежья. В настоящее время планируется расширение тематики обучения и контингента привлекаемых слушателей по эпидемиологии.

*Поступила 19.04.16*

Контактная информация: Брико Николай Иванович, д.м.н., проф.,  
119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, р.т. (499)248-69-70

## ПОЗДРАВЛЯЕМ

19 октября исполняется 85 лет со дня рождения **Николая Васильевича Медуницына**, российского иммунолога, аллерголога, академика РАН, Заслуженного деятеля науки, директора (1988—2009) НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А.Тарасевича.

Поздравляем юбиляра и желаем ему крепкого здоровья.

## СОДЕРЖАНИЕ

## CONTENTS

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Плетенева Е.А., Шабурова О.В., Буркалцева М.В., Крылов С.В., Каплан А.М., Чеснокова Е.Н., Полягач О.А., Ворошилова Н.Н., Михайлова Н.А., Зверев В.В., Крылов В.Н.* Новый подход к составлению смесей бактериофагов для антибактериальной терапии ..... 3
- Долгушин И.И., Шишкова Ю.С., Даровских С.Н., Комарова И.А., Вдовина Н.В., Мезенцева Е.А., Никущкина К.В.* Особенности модифицирующего действия низкоинтенсивных электромагнитных излучений природного и техногенного происхождения на жизнеспособность и функциональный статус нейтрофильных гранулоцитов ..... 11
- Лужнова С.А., Юшин М.Ю., Воронков А.В., Осыченко С.А., Габитова Н.М., Юртаева Е.А.* Экспериментальное исследование специфической активности производного 1,3-дiazинона-4 соединения ПЯТd1 *in vivo* ..... 18
- Хромова Е.А., Ахматова Э.А., Сходова С.А., Семочкин И.А., Хоменков В.Г., Ахматова Н.К., Костинов М.П.* Влияние противогриппозных вакцин на субпопуляции дендритных клеток крови ..... 23
- Алешкин В.А., Тихонова Н.Т., Герасимова А.Г., Цвиркун О.В., Шульга С.В., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А.* Проблемы на пути достижения элиминации кори в Российской Федерации ..... 29
- Останкова Ю.В., Семенов А.В., Файзуллаев Х.Н., Казакова Е.И., Козлов А.В., Мусабеев Э.И., Тотолян Арег А.* Молекулярно-биологические маркеры гепатита В у пациентов с фиброзом/циррозом печени в Узбекистане ..... 34
- Семенов А.В., Останкова Ю.В., Файзуллаев Х.Н., Казакова Е.И., Козлов А.В., Мусабеев Э.И., Тотолян Арег А.* Кольцевая ковалентно замкнутая ДНК ВГВ как маркер распространенности occultного гепатита В у пациентов с ВГВ, ВГД и ВГС инфекцией в Узбекистане ..... 43
- Чагина И.А., Борисова О.Ю., Кафарская Л.И., Афанасьев С.С., Алешкин В.А., Несвижский Ю.В., Афанасьев М.С., Алешкин А.В., Юсуф Е.В., Москвина Т.И., Пономарева Л.И., Карaulов А.В.* Состав популяции штаммов возбудителя дифтерии, циркулирующих в России ..... 50
- Яцышина С.Б., Рентеева А.Н., Валдохина А.В., Елькина М.А., Сперанская А.С., Пимкина Е.В., Минтаев Р.Р., Маркелов М.Л., Малеев В.В.* Генетическая характеристика вирусов гриппа А/Н3N2 и В, циркулировавших в России в 2013 — 2015 гг. .... 60
- Алыева М.Х., Зверев С.Я., Фелдблум И.В., Носкова Е.Ю., Канина А.О., Маркович Н.И.* Ассоциация некоторых однонуклеотидных полиморфизмов генов системы апоптоза с риском развития колоректального рака в российской популяции ..... 72

## ORIGINAL ARTICLES

- Pleteneva, E.A., Shaburova, O.V., Burkaltseva, M.V., Krylov, S.V., Kaplan, A.M., Chesnokova, E.N., Polygach, O.A., Voroshilova, N.N., Mikhailova, N.A., Zverev, V.V., Krylov, V.N.* Novel approach to composition of bacteriophage mixtures for antibacterial therapy ..... 3
- Dolgushin, I.I., Shishkova, Yu.S., Darovskikh, S.N., Komarova, I.A., Vdovina, N.V., Mezentseva, E.A., Nikushkina, K.V.* Features of modifying effect of low-intensity electromagnetic radiation of natural and technogenic origin on viability and functional status of neutrophilic granulocytes ..... 11
- Luzhnova, S.A., Yushin, M.Yu., Voronkov, A.V., Osyuchenko, S.A., Gabitova, N.M., Yurtaeva, E.A.* Experimental study of specific activity of 1,3-diazinon-4 compound PYaTd1 derivative *in vivo* ..... 18
- Chromova, E.A., Akhmatova, E.A., Skhodova, S.A., Semochkin, I.A., Khomenkov, V.G., Akhmatova, N.K., Kostinov, M.P.* Effect of influenza vaccines on subpopulations of blood dendritic cells ..... 23
- Aleshkin, V.A., Tikhonova, N.T., Gerasimova, A.G., Tsvirkun, O.V., Shulga, S.V., Ezhlova, E.B., Melnikova, A.A.* Problems towards measles elimination in Russian Federation ..... 29
- Ostankova, Yu.V., Semenov, A.V., Faizullaev, Kh.N., Kazakova, E.I., Kozlov, A.V., Musabaev, E.I., Totolyan, Areg A.* Molecular-biological markers of hepatitis B in patients with liver fibrosis/cirrhosis in Uzbekistan ..... 34
- Semenov, A.V., Ostankova, Yu.V., Faizullaev, Kh.N., Kazakova, E.I., Kozlov, A.V., Musabaev, E.I., Totolyan, Areg A.* HBV covalently closed circular DNA as a marker of prevalence of occult hepatitis B in patients with HBV, HDV and HCV infection in Uzbekistan ..... 43
- Chagina, I.A., Borisova, O.Yu., Kafarskaya, L.I., Afanasiev, S.S., Aleshkin, V.A., Nesvizhsky, Yu.V., Afanasiev, M.S., Aleshkin, A.V., Yusuf, E.V., Moskvina, T.I., Ponomareva, L.I., Karaulov, A.V.* Composition of population of diphtheria causative agent strains in Russia ..... 50
- Yatsyshina, S.B., Renteeva, A.N., Valdokhina, A.V., Elkina, M.A., Speranskaya, A.S., Pimkina, E.V., Mintaev, R.R., Markelov, M.L., Maleev, V.V.* Genetic characteristics of influenza A/H3N2 and B viruses that had circulated in Russia in 2013 — 2015 ..... 60
- Alyeva, M.Kh., Zverev, S.Ya., Feldblyum, I.V., Noskova, E.Yu., Kanina, A.O., Markovich, N.I.* Association of certain single nucleotide polymorphism genes of apoptosis system with a risk of development of colorectal cancer in Russian population ..... 72



## ОБЗОРЫ

- Захарова Ю.В.* Факторы адгезии бифидобактерий..... 80
- Костинов М.П., Шмитко А.Д., Соловьева И.Л., Сависко А.А., Полищук В.Б., Рыжов А.А., Черданцев А.П.* Необходима ли третья доза вакцины против кори — взгляд иммунолога... 88
- Дуванова О.В., Мишанкин Б.Н., Романова Л.В., Титова С.В.* Хитинолитический комплекс *Vibrio cholerae*: состав и роль в персистенции ..... 94
- Балмасова И.П., Аристанбекова М.С., Малова Е.С., Сепиашвили Р.И.* Механизмы взаимодействия вирусных возбудителей у больных, коинфицированных вирусами иммунодефицита человека и гепатита С ..... 101
- Оспельникова Т.П., Носейкина Е.М., Гайдерова Л.А., Ершов Ф.И.* Терапевтический потенциал препаратов альфа интерферонов при социально-значимых заболеваниях человека вирусной этиологии ..... 109

## В ПОМОЩЬ ПРЕПОДАВАТЕЛЮ

- Брико Н.И., Миндлина А.Я., Полибин Р.В.* Состояние и перспективы развития кадрового потенциала профессорско-преподавательского состава в области эпидемиологии..... 122

## REVIEWS

- Zakharova, Yu.V.* Factors of adhesion of bifidobacteria
- Kostinov, M.P., Shmitko, A.D., Solovieva, I.L., Savisko, A.A., Polischuk, V.B., Ryzhov, A.A., Cherdantsev, A.P.* Is a third dose of measles vaccine necessary — an immunologist's view
- Duvanova, O.V., Mishankin, B.N., Romanova, L.V., Titova, S.V.* *Vibrio cholerae* chitinolytic complex: the composition and the role in persistence
- Balmasova, I.P., Aristanbekova, M.S., Malova, E.S., Sepiashvili, R.I.* Mechanisms of interaction of viral causative agents in patients co-infected with human immunodeficiency and hepatitis C viruses
- Ospelnikova, T.P., Noseikina, E.M., Gaiderova, L.A., Ershov, F.I.* Therapeutic potential of alpha-interferon preparations during socially-significant human diseases of viral etiology

## GUIDELINES FOR LECTURER

- Briko, N.I., Mindlina, A.Ya., Polibin, R.V.* The state and prospects of development of personnel potential faculty in epidemiology

**Уважаемые читатели и авторы ЖМЭИ!**

**Продолжается подписка на I полугодие 2017 г.  
Индексы смотрите на 2 стр. журнала. Поддержите  
ЖМЭИ, подписавшись на I полугодие 2017 г.**