Том 13, № 2. С. 201–400

ISSN 2220-7619 (print)
ISSN 2313-7398 (online)

2023

ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

Данный выпуск реализован при финансовой поддержке Правительства Санкт-Петербурга

СЕВЕРО-ЗАПАДНОЕ ОТДЕЛЕНИЕ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ ИМЕНИ ПАСТЕРА
САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКОЕ РЕГИОНАЛЬНОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РОССИЙСКОЙ АССОЦИАЦИИ АЛЛЕРГОЛОГОВ И КЛИНИЧЕСКИХ ИММУНОЛОГОВ (СПб РО РААКИ)

ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

март–апрель
2023, том 13 **№ 2**

Журнал издается при участии Отделения Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов по Санкт-Петербургу и Ленинградской области

Учредители
Северо-Западное отделение медицинских наук
Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера
Санкт-Петербургское региональное отделение Российской ассоциации аллергологов и клинических иммунологов

Журнал зарегистрирован Управлением Федеральной службы по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций по Санкт-Петербургу и Ленинградской области
Свидетельство о регистрации ПИ № ТУ 78–00578 от 26 апреля 2010 г.
Свидетельство о регистрации ПИ № ТУ 78–00910 от 24 июня 2011 г.

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций
Свидетельство о регистрации ПИ № ФС 77–64788 от 02 февраля 2016 г.

Электронная версия журнала: www.iimmun.ru и www.elibrary.ru

С 2012 года журнал «Инфекция и иммунитет» входит в Перечень российских рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК РФ, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук

С 2014 года журнал «Инфекция и иммунитет» включен в международную базу Ulrich's Periodicals Directory

С 2016 года включен в базу данных Russian Science Citation Index (RSCI), интегрированную с платформой Web of Science

С 2016 года журнал «Инфекция и иммунитет» включен в Web of Science (Emerging Sources Citation Index)

С 2017 года журнал «Инфекция и иммунитет» включен в международную базу Scopus

Адрес редакции:
197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14.
Тел.: (812) 233-08-58.

Издательство НИИЭМ имени Пастера
197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14.
Тел./факс: (812) 644-63-11.
E-mail: izdatelstvo@pasteurorg.ru

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

Подписано в печать 24.04.2023 г. Формат 60 x 90 1/8.
Печать офсетная. Усл.-печ. л. 25.
Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.).
Заказ № 1107

NORTH-WEST REGIONAL BRANCH OF MEDICAL SCIENCES
SAINT PETERSBURG PASTEUR INSTITUTE
RUSSIAN ASSOCIATION OF ALLERGOLOGISTS AND CLINICAL IMMUNOLOGISTS,
ST. PETERSBURG REGIONAL BRANCH (SPb RAACI)

Russian Journal of Infection and Immunity

(Infektsiya i immunitet)

March–April

2023, volume 13 **No. 2**

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

Founders
North-West Regional Branch of Medical Sciences
Saint Petersburg Pasteur Institute
Russian Association of Allergologists and Clinical Immunologists, St. Petersburg Regional Branch (SPb RAACI)

The journal is registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass media in Saint Petersburg and Leningrad region
Certificate of registration PI no. TU 78–00578 from April, 26, 2010
Certificate of registration PI no. TU 78–00910 from June, 24, 2011

The journal is registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media
Certificate of registration PI no. FS 77–64788 from February, 02, 2016

Electronic version: www.iimmun.ru and www.elibrary.ru

Since 2012, the Infection and Immunity journal is admitted to the Index of leading peer-rewieded scientific journals intended for publication of key research results of MD Theses, as reccomended by the Higher Attestation Comission of the Russian Ministry of Education and Science

Since 2014 the Infection and Immunity journal is included into international Ulrich's Periodicals Directory database

Since 2016 included in Russian Science Citation Index (RSCI) database, integrated in Web of Science

Since 2016 the Russian Journal of Infection and Immunity is included in Web of Science (Emerging Sources Citation Index)

Since 2017 the Russian Journal of Infection and Immunity is included into international Scopus database

Editorial Office
197101, St. Petersburg, Mira str., 14.
Tel.: (812) 233-08-58.

Publishing House of St. Petersburg Pasteur Institute
197101, St. Petersburg, Mira str., 14.
Phone/fax: (812) 644-63-11.
E-mail: izdatelstvo@pasteurorg.ru

Produced at the Allegro Printing House
196084, Russian Federation, St. Petersburg, Koli Tomchaka str., 28.
Phone/fax: (812) 388-90-00.

Passed for printing 24.04.2023. Print format 60 x 90 1/8.
Offset printing. Printed sheets 25.
Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies).

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Оригинальные статьи

Краткие сообщения

В помощь практическому врачу

CONTENTS

Reviews

Original articles

Short communications

For the practical physicians

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 2, pp. 209–218

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 2, с. 209–218

РАЗРАБОТКА РЕАССОРТАНТНЫХ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН: КЛАССИЧЕСКОЕ СКРЕЩИВАНИЕ ИЛИ ОБРАТНАЯ ГЕНЕТИКА?

И.В. Киселева, Л.Г. Руденко

ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Важной особенностью гриппозных вакцин, отличающей их от других иммунобиологических препаратов, является то, что они не имеют постоянного состава. В связи с непрерывной антигенной изменчивостью вируса гриппа производство вакцин нуждается в своевременном обеспечении актуальными вакцинными штаммами, что невозможно при отсутствии адекватного метода своевременной, быстрой и бесперебойной подготовки вакцинных штаммов. Среди лицензированных гриппозных вакцин особое место занимают классические инактивированные и живые гриппозные вакцины. Их основу составляют реассортантные вакцинные штаммы, полученные при скрещивании актуального циркулирующего вируса гриппа с так называемым донорским штаммом (холодоадаптированным донором аттенуации для живых гриппозных вакцин или донором высокой урожайности для инактивированных вакцин). Вакцинные штаммы для лицензированных живых аттенуированных гриппозных вакцин представляют собой реассортантные вирусы с так называемой формулой генома 6:2 — два гена, кодирующих гемагглютинин и нейраминидазу (HA и NA) принадлежат актуальному эпидемическому вирусу, а шесть генов, кодирующих внутренние белки (PB2, PB1, PA, NP, M и NS) — холодоадаптированному донору аттенуации. Доноров аттенуации существует очень ограниченное количество. В России это холодоадаптированные вирусы A/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и B/СССР/60/69, в США (компания MedImmune) — вирусы A/Ann Arbor/6/60ca (H2N2) и B/Ann Arbor/1/66ca. MedImmune производит вакцинные штаммы методом обратной генетики. Для других стран использование этого подхода для получения вакцин ограничено необходимостью приобретения лицензии у патентообладателей. В России пока не разрешены генетические манипуляции со штаммами для сезонной живой гриппозной вакцины, поэтому реассортанты для отечественной живой гриппозной вакцины создаются только путем классической реассортации в куриных эмбрионах. Штаммы для инактивированной гриппозной вакцины готовят только методом класической реассортации, требования к ним более гибкие и допускают различные сочетания генов от «дикого» вируса и донорского штамма. В качестве доноров внутренних генов используют высокоурожайные вирусы, такие как A/PR/8/34 (H1N1), A/Texas/1/77 (H3N2), B/Lee/40 и некоторые другие. К сожалению, метод классической реассортации не всегда позволяет оперативно получить реассортантный вирус с формулой генома 6:2. Этому мешает ряд причин, начиная с уникальных свойств конкретного эпидемического вируса и заканчивая констелляцией генов. Метод обратной генетики на основе плазмид представляет собой альтернативный подход к созданию реассортантных вакцинных штаммов, который позволяет гарантированно и быстро получать реассортантные вирусы заданной формулы генома 6:2. Однако и этот

Адрес для переписки:
Киселева Ирина Васильевна
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12,
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.
Тел.: 8 (812) 234-68-60.
Факс: 8 (812) 234-68-68.
E-mail: irina.v.kiseleva@mail.ru

Contacts:
Irina V. Kiseleva
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Academician Pavlov str., 12, Institute of Experimental Medicine.
Phone: +7 (812) 234-68-60.
Fax: +7 (812) 234-68-68.
E-mail: irina.v.kiseleva@mail.ru

Для цитирования:
Киселева И.В., Руденко Л.Г. Разработка реассортантных гриппозных вакцин: классическое скрещивание или обратная генетика? // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 2. С. 209–218. doi: 10.15789/2220-7619-DOR-2449

Citation:
Kiseleva I.V., Rudenko L.G. Development of reassortant influenza vaccines: classical reassortment or reverse genetics? // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 2, pp. 209–218. doi: 10.15789/2220-7619-DOR-2449

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 23-25-00070.

This work was supported financially by the Russian Science Foundation, grant No. 23-25-00070.

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-DOR-2449

метод имеет определенные слабые места. В настоящем обзоре рассматриваются преимущества и недостатки подготовки реассортантных гриппозных вакцин методами обратной генетики и классической реассортации в развивающихся куриных эмбрионах.

Ключевые слова: *грипп, профилактика, живые гриппозные вакцины, инактивированные гриппозные вакцины, реассортанты, обратная генетика.*

DEVELOPMENT OF REASSORTANT INFLUENZA VACCINES: CLASSICAL REASSORTMENT OR REVERSE GENETICS?

Kiseleva I.V., Rudenko L.G.

Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. An important feature of influenza vaccines, which distinguishes them from other immunobiological preparations, is that they have no fixed composition. Due to the constant influenza virus antigenic variability, production facilities require timely supply with relevant vaccine strains undoable due to the lack of proper method for the convenient, rapid and uninterrupted development of vaccine strains. Among the licensed influenza vaccines, classical inactivated and live influenza vaccines hold a special place. They are based on reassortant vaccine strains obtained by crossing currently circulating influenza virus with the so-called donor strain (cold-adapted attenuation donor for live influenza vaccines or high yield donor for inactivated vaccines). Vaccine strains for licensed live attenuated influenza vaccines are reassortants with the so-called 6:2 genome formula — two genes encoding hemagglutinin and neuraminidase (HA and NA) belong to the current epidemic virus, and six genes encoding internal proteins (PB2, PB1, PA, NP, M and NS) — to cold-adapted master donor virus. There is a very limited number of donors of attenuation. In Russia, there are cold-adapted viruses A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) and B/USSR/60/69; in the USA (MedImmune) there are viruses A/Ann Arbor/6/60ca (H2N2) and B/Ann Arbor/1/66ca. MedImmune produces vaccine strains using reverse genetics technique. For other countries, this approach for obtaining vaccines is limited due to the need to purchase a license from the patent holders. In Russia, genetic manipulations with strains for the seasonal live influenza vaccine are not yet allowed; reassortants for the Russian live influenza vaccine are created only by classical reassortment in embryonated chicken eggs. Vaccine candidates for the inactivated influenza vaccine are prepared by the classical reassortment method, the requirements for them are more flexible and allow to use diverse genes combinations from "wild type" virus and master donor virus. High-yielding viruses such as A/PR/8/34 (H1N1), A/Texas/1/77 (H3N2), B/Lee/40 and some others are used as donors of internal genes. Unfortunately, the classical reassortment method does not always allow to promptly obtain a reassortant virus with a 6:2 genome formula. This is hindered by a number of reasons, ranging from the unique properties of a certain epidemic virus ending up with the constellation of genes. The reverse genetics method based on plasmids is an alternative approach to create reassortant vaccine strains allowing to reliably and quickly obtain reassortant viruses of a set 6:2 genome formula. However, this method also has certain weaknesses. This review discusses the advantages and disadvantages of development of conventional influenza vaccine candidates by reverse genetics and classical reassortment in developing chick embryos.

Key words: *influenza, prophylaxis, live influenza vaccines, inactivated influenza vaccines, reassortants, reverse genetics.*

Введение

Способность вирусов гриппа к реасортации была установлена в середине XX в. благодаря новаторским работам таких ученых, как Frank Burnet и George Hirst, и с тех пор активно используется в научных исследованиях и практике, в частности, при подготовке гриппозных вакцин. Современные гриппозные вакцины представляют собой трех- и даже четырехкомпонентный препарат, состоящий из вирусов гриппа A(H1N1), A(H3N2) и вируса(ов) гриппа B одной или двух генетических линий. Важной особенностью гриппозных вакцин, отличающей их от любых других иммунобиологических препаратов, является то, что они не имеют постоянного состава штаммов. В связи с изменчивостью антигенных свойств вируса гриппа, для поддержания высокого уровня профилактической эффективности производство нуждается в регулярном и своевременном обеспечении новыми актуальными вакцинными штаммами.

Реассортантные вакцинные штаммы составляют основу современных живых (ЖГВ) [57] и инактивированных (ИГВ) [56] гриппозных вакцин. Эти вакцины представляют собой реассортанты, полученные при скрещивании актуального циркулирующего вируса гриппа с донорским штаммом (холодоадаптированным донором аттенуации для живых гриппозных вакцин или донором высокой урожайности для инактивированных вакцин). В настоящее время для подготовки штаммов реассортантных гриппозных вакцин используются методы классической реассортации и обратной генети-

ки [19, 58]. Метод классической реассортации не всегда позволяет получить реассортантный вирус с вакцинной формулой генома 6:2 (белки HA и NA — от эпидемического («дикого») родителя, а PB2, PB1, PA, NP, M и NS — от донорского штамма). Этому мешает ряд причин, начиная с уникальных свойств конкретного эпидемического вируса и заканчивая констелляцией генов [12, 26, 27, 49]. Все это увеличивает объем работы и отнимает много времени. Метод обратной генетики представляет собой альтернативный подход к созданию реассортантных вакцинных штаммов, который позволяет гарантированно и быстро получать реассортантные вирусы заданной формулы генома, свободные от мутаций, неизбежно появляющихся в геноме в результате пассирования вирусов в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) [8, 19].

В настоящем обзоре рассматриваются преимущества и недостатки подготовки реассортантных гриппозных вакцин методами обратной генетики и классической реассортации в РКЭ.

Реассортантные гриппозные вакцины. Оптимальный состав генома вакцинного штамма

Живые реассортантные гриппозные вакцины

Современные живые реассортантные гриппозные вакцины представляют собой реассортанты, полученные при скрещивании актуального циркулирующего вируса гриппа с аттенуированным холодоадаптированным (ХА) донором аттенуации. Всего четыре ХА (приспособленных к репликации при низких температурах — 25–26°C) вируса используются в мире в качестве доноров для лицензированных ЖГВ: два отечественных донора — A/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и B/СССР/60/69 [1] и два донора для вакцины американской компании MedImmune — A/Ann Arbor/6/60ca (H2N2) и B/Ann Arbor/1/66ca [10].

Для получения реассортантного вакцинного штамма для ЖГВ с вакцинной формулой генома 6:2 из восьми сегментов РНК от «дикого» вируса в геноме реассортанта оставляют только гены, кодирующие HA и NA, ответственные за антигенную новизну и иммуногенность вакцины. Остальные шесть сегментов, отвечающих за безопасность ЖГВ, получают от ХА донора аттенуации; они передают кандидату ЖГВ температурную чувствительность (неспособность к репликации при температурах выше оптимального диапазона), ХА фенотип и способность к активной репликации в РКЭ при оптимальной температуре [45, 46]. Такой состав генома считается оптимальным для живой гриппозной вакцины. Вакцинный вирус сохраняет способность размножаться в эпителии верхних дыхательных путей и индуцировать в ходе бессимптомной инфекции все основные звенья приобретенного иммунитета.

Классический метод получения реассортантных вакцинных штаммов ЖГВ с формулой генома 6:2 включает в себя скрещивание в РКЭ при 32°C родительских вирусов (ХА донора аттенуации и эпидемического вируса, взятых в равных инфекционных дозах), селективные пассажи в присутствии антисыворотки к донору аттенуации при пониженной до 25–26°C температуре с последующим клонированием предельными разведениями [45, 46]. Теоретически при скрещивании двух штаммов вируса гриппа возможно формирование 256+2 различных комбинаций генов. Использование двух мощных селектирующих факторов — антисыворотки к донору аттенуации и пониженной температуры инкубации — приводит к существенному снижению количества нежелательных комбинаций, однако в ряде случаев их число продолжает оставаться достаточно большим, о чем речь пойдет ниже.

Кандидаты для отечественной ЖГВ на основе доноров A/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и B/СССР/60/69 получают путем классической реассортации в РКЭ [30, 46, 47, 53]. Кандидаты в ЖГВ, основанные на американских донорах A/Ann Arbor/6/60ca (H2N2) и B/Ann Arbor/1/66ca, конструируют с тем же составом генома 6:2, но используют для этого методы обратной генетики [6, 10, 32]. Независимо от метода получения, кандидаты в ЖГВ сохраняют полный набор аттенуирующих мутаций и, как следствие, типичный для вакцинных штаммов ЖГВ температурочувствительный и холодоадаптированный фенотип.

Инактивированные реассортантные гриппозные вакцины

Штаммы для ИГВ готовят методом классической реассортации [35]. В отличие от ЖГВ, требования к штаммам для ИГВ более гибкие и допускают разнообразные сочетания генов от «дикого» вируса и донорского штамма. В качестве доноров внутренних генов используют высокоурожайные вирусы A/PR/8/34 (H1N1), A/Texas/1/77 (H3N2), B/Lee/40 или реассортантные вакцинные штаммы для ИГВ [35]. В последнем случае в состав генома реассортанта для ИГВ могут входить гены от трех разных родительских вирусов [35]. При подготовке вакцинных штаммов для ИГВ должны соблюдаться два важных условия: 1) гены, кодирующие поверхностные белки HA и NA, принадлежат эпидемическому вирусу и 2) в состав генома

входят гены (донора или эпидемического вируса), обеспечивающие высокую урожайность реассортанта. В частности, для получения реассортантов-кандидатов в ИГВ типа А с высокими титрами гемагглютинина необходим М-ген от донора A/PR/8/34 (H1N1) [7, 14, 20], а для кандидатов в ИГВ типа В – ген NP от донора B/Lee/40 [28, 36].

Особенности классической реассортации

При классической реассортации в РКЭ природа создает реассортанты, содержащие оптимальные жизнеспособные сочетания родительских генов; как правило, 6:2 реассортанты получаются достаточно легко. Однако иногда при классическом скрещивании в РКЭ желаемый состав генома 6:2 оказывается неоптимальным. Определенные композиции генома, и в том числе 6:2, могут оказаться функционально несовместимыми и имеют пониженную жизнеспособность. Как результат, в вирусном потомстве будут преобладать другие, более жизнеспособные комбинации. Целый ряд публикаций подтверждает это предположение. Так, Subbarrao и др. [49] не удалась реассортация вирусов гриппа человека A(H1N1) с вирусами гриппа чаек A(H13N6) с желаемым составом генома 6:2. Реассортанты вирусов гриппа A(H5N2) [42] или A(H1N1)pdm09 [17, 54] с формулой генома 5:3, полученные классическим способом, оказались более высокоурожайными, чем их 6:2 аналоги. Gilbertson и др. [15] продемонстрировали, что 5:3 реассортанты, содержащие ген PB1 от «дикого» вируса A(H1N1)pdm09, а HA и NA — от вирусов A(H5N1) или A(H7N9), обеспечивали более высокую урожайность, чем 6:2 варианты. Авторы предположили, что PB1 ген «дикого» вируса A(H1N1)pdm09 обеспечивает реассортантным вирусам преимущества в росте. В 2009 г. для улучшения репликационных свойств кандидатов в ИГВ были подготовлены два классических реассортантных вируса для ИГВ с формулой генома 5:3 (X-181 и X-181A) с тремя генами (PB1, HA и NA) от пандемического вируса A/California/07/2009 (H1N1) pdm09 и пятью — от донора A/PR/8/34 [17, 54]. Вероятно, для данных пар родительских вирусов формула 6:2 не была оптимальной.

5:3 реассортант для ЖГВ (гены HA, NA и M происходили от родителя «дикого» типа) по данным РТГА оказался более иммуногенным для мышей, чем его 6:2 аналог [59]. Классическая реассортация не привела и к получению 6:2 кандидатов в ЖГВ на основе вирусов гриппа птиц H5N2 или H5N1 и ХА донора аттенуации A/Ленинград/134/17/57 (H2N2); авторами были получены только 7:1 реассортанты, унаследовавшие от «дикого» родителя единственный ген — HA [12, 26, 27]. Однако в клинических испытаниях живые гриппозные вакцины против потенциально пандемического гриппа H5N1, подготовленные на основе таких 7:1 реассортантов, были безопасны и иммуногенны [40, 41], не уступая в выраженности иммунного ответа сезонным ЖГВ.

Биологические свойства «дикого» родительского вируса, влияющие на эффективность его классической реасортации с донорским штаммом

Эпидемические вирусы гриппа обладают целым рядом уникальных биологических свойств, таких как температуроустойчивость/температурочувствительность репродукции при температурах, находящихся за верхними пределами температурного оптимума (38–40°C) [3, 4], чувствительность гемагглютинина к pH и высоким температурам [11, 33, 48], непосредственным образом связанная с его стабильностью, холодочувствительность/холодоустойчивость репродукции при температурах, находящихся за нижними пределами температурного оптимума (25–26°C) [4], чувствительность к неспецифическим гамма-ингибиторам сыворотки крови [3, 24, 31, 43], способность агглютинировать эритроциты определенных видов животных (современные вирусы гриппа A(H1N1)pdm09 и B агглютинируют эритроциты широкого спектра видов животных и птиц, таких как куры, индейки, лошади, морские свинки и человека 0 (I) группы крови, в то в ремя как вирусы A(H3N2) вступают в реакцию гемагглютинации только с эритроцитами морской свинки и человека) [18, 51, 55].

Из-за особенностей селектирующих факторов классического скрещивания эпидемических вирусов с ХА донорами аттенуации живой гриппозной вакцины, два момента оказывают существенное влияние на эффективность реассортации — холодочувствительность/холодоустойчивость репродукции эпидемических вирусов и их чувствительность к неспецифическим гамма-ингибиторам сыворотки крови. Под эффективностью реассортации в данном контексте мы подразумеваем эффективность (%) выхода реассортантов с формулой генома 6:2.

В схему подготовки реассортантов для инактивированной гриппозной вакцины входят пассажи только при оптимальной температуре инкубации [35], поэтому здесь фактор устойчивости/чувствительности «дикого» родительского вируса к пониженной температуре роли не играет. В данном случае остается только одно свойство «дикого» родительского вируса, которое может повлиять на эффективность реассортации — его ингибиторочувствительность.

Чувствительность вирусов «дикого» типа к неспецифическим термостабильным сывороточным гамма-ингибиторам

Среди биологических свойств вирусов гриппа особое место занимает их чувствительность к неспецифическим термостабильным гамма-ингибиторам сыворотки [24, 31, 43]. Из-за различной рецепторной специфичности вирусы гриппа «дикого» типа проявляют заметные различия в ингибиторочувствительности. Вирусы гриппа A(H3N2), которые преимущественно связываются с рецепторами альфа-2,6, высокочувствительны к сывороточным термостабильным гамма-ингибиторам, в то время как штаммы A(H1N1) с альфа-2,3 или смешанной альфа-2,3/альфа-2,6 специфичностью проявляют устойчивый к гамма-ингибиторам фенотип [21, 37, 38]. Что касается вирусов гриппа B, то до 1970–80-х гг. подавляющее их большинство обладало ингибитороустойчивым фенотипом. После разделения в 1980-х гг. вирусов гриппа B на две генетические линии, B/Victoria и B/Yamagata [39], викторианские вирусы сохранили высокий уровень устойчивости к ингибиторам, а вирусы линии B/Yamagata приобрели к ним высокую чувствительность [5].

Использование антидонорской сыворотки при приготовлении вакцинных штаммов методом классического скрещивания в РКЭ [46, 47, 53] обеспечивает избирательное преимущество реассортантов в наследовании HA и NA от антигенно релевантного вируса «дикого» типа. Однако получение 6:2 реассортантов на основе ингибиторочувствительных «диких» вирусов может быть существенно затруднено неспецифическим связыванием их HA с термостабильными гамма-ингибиторами, сохраняющимися в любой сыворотке после ее обработки рецептор-разрушающим ферментом и, таким образом, постоянно присутствующими и в сыворотке против донорского вируса [2, 21].

Данные, представленные в [2, 21], были использованы нами для построения рисунка. Анализ состава генома 883 реассортантов, полученных методом классической реассортации в развивающихся куриных эмбрионах ХА доноров аттенуации с 40 вирусами гриппа «дикого» типа, обладающими разной степенью чувствительности к неспецифическим гамма-ингибиторам, выявил следующую закономерность: вне зависимости от чувствительности или устойчивости эпидемических родительских штаммов к ингибиторам все реассортанты унаследовали HA от «дикого» родителя; при этом принадлежность остальных генов варьировала. Большинство реассортантов на основе ингибитороустойчивых вирусов «дикого» типа (89%) унаследовали «дикую» NA; при этом около трети полученных реассортантов (31%) обладали вакцинной формулой генома 6:2 (рис., А).

Напротив, эффективность получения 6:2 реассортантов была значительно ниже (7%), если «дикий» родительский вирус обладал высокой степенью чувствительности к неспецифическим термостабильным гамма-ингибиторам. В этом случае наблюдалось нарушение констелляции генов, кодирующих HA и NA — только четверть всех реассортантов унаследовали от «дикого» вируса одновременно и HA, и NA, а три четверти — «дикий» HA и донорскую NA. При этом 25% составили реассортанты с формулой генома 7:1 (рис., Б).

Таким образом, чувствительность вирусов «дикого» типа к ингибиторам становится серьезным препятствием для эффективного приготов-

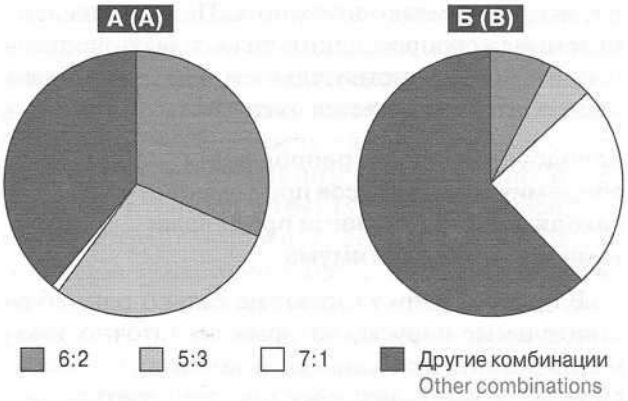


Рисунок. Геномный состав реассортантов (в %), полученных методом классической реассортации ХА доноров аттенуации для ЖГВ с (А) 20 резистентными или (Б) 20 чувствительными к неспецифическим термостабильным гамма-ингибиторам «дикими» вирусами гриппа A(H1N1), A(H2N2), A(H3N2), B/Victoria и B/Yamagata (по материалам [2, 21])

Figure. Genome composition (%) of reassortant influenza virus strains derived by classical reassortment of cold-adapted master donor viruses with A(H1N1), A(H2N2), A(H3N2), B/Victoria lineage, and B/Yamagata lineage wild type influenza viruses: (A) 20 resistant or (B) 20 sensitive to nonspecific thermostable gamma-inhibitors (based on [2, 21])

Примечание. Состав генома 6:2 — HA и NA унаследованы от «дикого» родителя, а 6 внутренних генов унаследованы от донора; состав генома 5:3 — HA, NA и один из внутренних генов унаследованы от «дикого» родителя, остальные пять внутренних генов унаследованы от донора; состав генома 7:1 — HA унаследован от «дикого» родителя, все внутренние гены и NA унаследованы от донора.

Note. 6:2 genome composition — HA and NA are inherited from the wild type parent, and 6 internal genes are inherited from master donor virus; 5:3 genome composition — HA, NA and one of the internal genes are inherited from the wild type parent virus strain, the other five internal genes are inherited from master donor virus; 7:1 genome composition — HA is inherited from wild type parent, all internal genes and NA are inherited from master donor virus.

ления методом классической реассортации вакцинных реассортантов 6:2 для ЖГВ, поскольку в процессе скрининга участвует иммунная сыворотка против донорского штамма, содержащая значительное количество термостабильных гамма-ингибиторов. Наоборот, устойчивость к ингибиторам гарантирует более быстрый и стабильный результат при получении вакцинных штаммов. Разработка ЖГВ на основе классического метода реассортации выиграла бы, если бы ВОЗ рекомендовала для производства вакцин вирусы с высоким уровнем устойчивости к ингибиторам. С другой стороны, чувствительные к ингибиторам вирусы предпочитают альфа-2,6-связи [38], более характерные для вирусов гриппа млекопитающих. Поэтому на данный момент вопрос, каким должен быть вакцинный штамм — чувствительным или устойчивым к ингибиторам, остается открытым.

Холодоустойчивость репродукции эпидемических вирусов при температурах, находящихся за нижними пределами температурного оптимума

В природе циркулируют не только термочувствительные вирусы, которых достаточно много, но иногда появляются и холодоустойчивые вирусы, размножающиеся при температуре инкубации, пониженной до 25–26°С [23]. Для «диких» вирусов использование термина «ХА» (холодоадаптированные) не совсем корректно, так как эти вирусы не были адаптированы к низким температурам путем искусственных лабораторных манипуляций. Уместнее было бы говорить о вирусах «дикого» типа, обладающих естественной устойчивостью к низким температурам.

ХА-фенотип природно устойчивых к холоду эпидемических вирусов гриппа нарушает те этапы процесса подготовки ХА вакцинных штаммов для ЖГВ, которые осуществляются при пониженной до 25–26°С температуре. Потеря ХА-селективного фактора может привести к значительному увеличению общего числа ХА-реассортантов, но количество реассортантов для ЖГВ с желаемым составом генома 6:2 уменьшится.

Поскольку этап холодовой инкубации в процессе подготовки вакцинных штаммов ИГВ отсутствует, свойство природной холодоадаптированности, присущее отдельным «диким» вирусам, не отражается негативно на эффективности приготовления вакцинного штамма.

Плюсы и минусы обратной генетики

Преимущества метода обратной генетики при подготовке гриппозных вакцин

Открытие полимеразной цепной реакции [44] и технологии обратной генетики на основе плазмид [16] дали возможность не только реконструировать реликтовые [50, 52] и современные эпидемические вирусы гриппа, но и быстро и бесперебойно создавать реассортантные штаммы для гриппозных вакцин [9, 16, 34]. Обратно-генетический подход имеет ряд неоспоримых преимуществ при получении вакцинных штаммов. Технологии обратной генетики позволяют искусственно манипулировать геномом вируса гриппа и являются мощным инструментом для создания «суррогатного» реассортантного вируса с любым желаемым геномным составом. Кроме того, обратно-генетический подход снижает вероятность спонтанного появления нежелательных мутаций [13, 17, 34]. Во время пандемии гриппа, когда необходимо очень быстро произвести большое количество вакцин, метод обратной генетики может быть предпочтительнее классического подхода. Более того, только он позволяет получать кандидатные реассортантные вакцины против высокопатогенных вирусов птичьего гриппа с делецией детерминант высокой патогенности в гене, кодирующем гемагглютинин (многоосновный сайт расщепления) [17].

Говоря о преимуществах обратно-генетических технологий не следует забывать, что круг гриппозных вакцин очень широк и не ограничивается только лицензированными классическими реассортантными вакцинами, ИГВ и ЖГВ. В настоящее время активно разрабатываются вакцины нового поколения, такие как разнообразные универсальные вакцины, основанные на векторных и других технологиях, и их конструирование невозможно без методов обратной генетики [25, 29].

Недостатки метода обратной генетики при подготовке реассортантных гриппозных вакцин

Все вышесказанное касалось неоспоримых преимуществ метода обратной генетики. Однако у него есть и другая сторона. Теоретически этот метод кажется быстрее, так как в этом случае нет необходимости тратить время на первые этапы классической реассортации. На самом деле качество этого метода не всегда может быть удовлетворительным; реассортанты, принудительно полученные искусственным путем, могут оказаться менее жизнеспособными, обладающими невысокой репродуктивной активностью, из-за чего могут потребоваться дополнительные пассажи вирусного потомства в РКЭ для достижения дополнительной адаптации и повышения инфекционных титров вируса [8].

Одна из причин, по которой классический метод реассортации для производства гриппозных вакцин может быть предпочтительнее подходов обратной генетики, заключается в том, что он позволяет осуществлять естественный отбор

вариантов с оптимальным набором мутаций, улучшающим ростовые свойства реассортанта в РКЭ [14, 60]. Это важно, поскольку производство живых гриппозных вакцин базируется на использовании РКЭ. При реассортации, проводимой методом классического скрещивания вируса «дикого» типа с донорским штаммом, вирусное потомство проходит не менее 7 пассажей в РКЭ (скрещивание родительских вирусов, два селективных пассажа, при необходимости — 1–2 слепых пассажа, 2–3 клонирования и накопление отобранного реассортанта) [22, 30, 46, 47, 53]. Следует также учитывать и те пассажи, которые осуществляются уже на производстве. В результате вирусное потомство приобретает дополнительные адаптационные к репродукции в РКЭ мутации, что приводит к преимущественному отбору быстрорастущих реассортантов, эффективно размножающихся в РКЭ. Это можно сравнить с процессом микроэволюции вируса, в результате которой в куриных эмбрионах происходит естественный отбор наиболее жизнеспособных и наиболее приспособленных к репликации в РКЭ клонов.

Известны случаи, когда методом классической реассортации вообще не удавалось получить реассортанты с желаемой формулой генома 6:2 [26, 27, 49]. В такой ситуации на помощь может прийти обратная генетика, которая позволит принудительно сконструировать реассортант с нужной формулой генома. Однако следует учитывать, что природа не терпит насилия. Будет ли такой реассортант 6:2 достаточно хорош? Нужно ли идти против природы, если оптимальная констелляция генов для данной пары родительских вирусов не 6:2, а, например, 5:3 или 7:1? Что лучше — генно-инженерная 6:2 конструкция сомнительного качества или высокопродуктивный реассортант 7:1, полученный естественным путем? Эти вопросы все еще ждут ответов.

Заключение

Оба описанных в обзоре метода имеют свои сильные и слабые стороны, свои достоинства и недостатки. В каких случаях лучше использовать методы классической реассортации, а в каких — обратно-генетические подходы? Очевидно, что если речь идет о, например, создании векторных вакцин, когда нужно изменить ангитенную структуру вируса-носителя путем встраивания в него антигенно-значимых эпитопов чужеродного патогена, то это возможно только с использованием методов обратной генетики. В случае же создания классических гриппозных вакцин, живых или инактивированных, методы обратной генетики и классической реассортации могут эффективно дополнять друг друга.

Список литературы/References

1. Жданов В.М., Александрова Г.И., Гендон Ю.З. Живая гриппозная рекомбинантная вакцина в СССР: Разработка, изучение и практическое использование // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1986. № 7. С. 3–14. [Zhdanov V.M., Alexandrova G.I., Ghendon Y.Z. Live influenza recombinant vaccine in the USSR: Development, study and practical use. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 1986, no. 7, pp. 3–14. (In Russ.)*]
2. Киселева И.В., Баженова Е.А., Ларионова Н.В., Федорова Е.А., Дубровина И.А., Исакова-Сивак И.Н., Руденко Л.Г. Особенности реассортации современных штаммов вируса гриппа с донорами аттенуации живой гриппозной вакцины // Вопросы вирусологии. 2013. Т. 58, № 5. С. 26–31. [Kiseleva I.V., Bazhenova E.A., Larionova N.V., Fedorova E.A., Dubrovina I.A., Isakova-Sivak I.N., Rudenko L.G. Peculiarity of reassortment of current wild type influenza viruses with master donor viruses for live influenza vaccine. *Voprosy virusologii = Problems of Virology, 2013, vol. 58, no. 5, pp. 26–31. (In Russ.)*]
3. Ларионова Н.В., Киселева И.В., Баженова Е.А., Григорьева Е.П., Руденко Л.Г. Влияние биологических свойств сезонных вирусов гриппа на эффективность подготовки штаммов живой гриппозной вакцины // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2019. № 5. С. 24–34. [Larionova N.V., Kiseleva I.V., Bazhenova E.A., Grigorieva E.P., Rudenko L.G. The influence of seasonal influenza viruses biological features on the effectiveness of development strains for live influenza vaccine. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 2019, no. 5, pp. 24–34. (In Russ.)*] *doi: 10.36233/0372-9311-2019-5-24-34*
4. Ларионова Н.В., Киселева И.В., Руденко Л.Г. Эволюция вирусов гриппа по признаку чувствительности к температуре репродукции // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2019. № 6. С. 47–55. [Larionova N.V., Kiseleva I.V., Rudenko L.G. Evolution of influenza viruses based on sensitivity to temperature of replication. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 2019, no. 6, pp. 47–55. (In Russ.)*] *doi: 10.36233/0372-9311-2019-6-47-55*
5. Ларионова Н.В., Киселева И.В., Исакова И.Н., Литвинова О.М., Руденко Л.Г. Фенотипические особенности эпидемических штаммов вируса гриппа В разных лет выделения // Вопросы вирусологии. 2006. № 5. С. 38–41. [Larionova N., Kiseleva I., Isakova I., Litvinova O., Rudenko L. Naturally occuring temperature-sensitive strains of influenza B virus. *Voprosy virusologii = Problems of Virology, 2006, vol. 51, no. 5, pp. 38–41. (In Russ.)*]
6. Ambrose C.S., Luke C., Coelingh K. Current status of live attenuated influenza vaccine in the United States for seasonal and pandemic influenza. *Influenza Other Respir. Viruses, 2008, vol. 2, no. 6, pp. 193–202. doi: 10.1111/j.1750-2659.2008.00056.x*
7. Baez M., Palese P., Kilbourne E.D. Gene composition of high-yielding influenza vaccine strains obtained by recombination. *J. Infect. Dis., 1980, vol. 141, no. 3, pp. 362–365. doi: 10.1093/infdis/141.3.362*

8. Bazhenova E., Kiseleva I., Isakova-Sivak I., Kotomina T. Two alternative approaches to generate live attenuated influenza vaccine candidates against potentially pandemic avian influenza H7N9 virus. *Biomed. J. Sci. Tech. Res., 2018, vol. 3, no. 4, pp. 3363–3365. doi: 10.26717/BJSTR.2018.03.000925*
9. Blanco-Lobo P., Nogales A., Rodríguez L., Martínez-Sobrido L. Novel approaches for the development of live attenuated influenza vaccines. *Viruses, 2019, vol. 11, no. 2: 190. doi: 10.3390/v11020190*
10. Carter N.J., Curran M.P. Live attenuated influenza vaccine (Flumist®; FluenztmTM): A review of its use in the prevention of seasonal influenza in children and adults. *Drugs, 2011, vol. 71, no. 12, pp. 1591–1622. doi: 10.2165/11206860-000000000-00000*
11. Costello D.A., Whittaker G.R., Daniel S. Variations in pH sensitivity, acid stability, and fusogenicity of three influenza virus H3 subtypes. *J. Virol., 2015, vol. 89, no. 1, pp. 350–360. doi: 10.1128/jvi.01927-14*
12. Desheva J.A., Lu X.H., Rekstin A.R., Rudenko L.G., Swayne D.E., Cox N.J., Katz J.M., Klimov A.I. Characterization of an influenza A/H5N2 reassortant as a candidate for live-attenuated and inactivated vaccines against highly pathogenic H5N1 viruses with pandemic potential. *Vaccine, 2006, vol. 24, no. 47–48, pp. 6859–6866. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.06.023*
13. Fodor E., Devenish L., Engelhardt O.G., Palese P., Brownlee G.G., García-Sastre A. Rescue of influenza a virus from recombinant DNA. *J. Virol., 1999, vol. 73, no. 11, pp. 9679–9682. doi: 10.1128/jvi.73.11.9679-9682.1999*
14. Fulvini A.A., Ramanunninair M., Le J., Pokorny B.A., Arroyo J.M., Silverman J., Devis R., Bucher D. Gene constellation of influenza A virus reassortants with high growth phenotype prepared as seed candidates for vaccine production. *PLoS One, 2011, vol. 6, no. 6: e20823. doi: 10.1371/journal.pone.0020823*
15. Gilbertson B., Zheng T., Gerber M., Printz-Schweigert A., Ong C., Marquet R., Isel C., Rockman S., Brown L. Influenza NA and PB1 gene segments interact during the formation of viral progeny: localization of the binding region within the PB1 gene. *Viruses, 2016, vol. 8, no. 8: 238. doi: 10.3390/v8080238*
16. Hoffmann E., Krauss S., Perez D., Webby R., Webster R.G. Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines. *Vaccine, 2002, vol. 20, no. 25–26, pp. 3165–3170. doi: 10.1016/s0264-410x(02)00268-2*
17. Hussain S., Turnbull M.L., Pinto R.M., McCauley J.W., Engelhardt O.G., Digard P. Segment 2 from Influenza A(H1N1) 2009 pandemic viruses confers temperature-sensitive haemagglutinin yield on candidate vaccine virus growth in eggs that can be epistatically complemented by PB2 701D. *J. Gen. Virol., 2019, vol. 100, no. 7, pp. 1079–1092. doi: 10.1099/jgv.0.001279*
18. Ito T., Suzuki Y., Mitnaul L., Vines A., Kida H., Kawaoka Y. Receptor specificity of influenza A viruses correlates with the agglutination of erythrocytes from different animal species. *Virology, 1997, vol. 227, no. 2, pp. 493–499. doi: 10.1006/viro.1996.8323*
19. Jin H., Subbarao K. Live attenuated influenza vaccine. *Curr. Top. Microbiol. Immunol., 2015, vol. 386, pp. 181–204. doi: 10.1007/82_2014_410*
20. Johansson B.E., Bucher D.J., Pokorny B.A., Mikhail A., Kilbourne E.D. Identification of PR8 M1 protein in influenza virus high-yield reassortants by M1-specific monoclonal antibodies. *Virology, 1989, vol. 171, no. 2, pp. 634–636. doi: 10.1016/0042-6822(89)90638-7*
21. Kiseleva I., Larionova N., Fedorova E., Bazhenova E., Dubrovina I., Isakova-Sivak I., Rudenko L. Contribution of neuraminidase of influenza viruses to the sensitivity to sera inhibitors and reassortment efficiency. *Open Microbiol. J., 2014, vol. 8, pp. 59–70. doi: 10.2174/1874285801408010059*
22. Kiseleva I.V., Larionova N.V., Fedorova E.A., Isakova-Sivak I.N., Rudenko L.G. New methodological approaches in the development of Russian live attenuated vaccine for pandemic influenza. *Translational Biomedicine, 2015, vol. 6, no. 2: 13, pp. 1–9. doi: 10.21767/2172-0479.100013*
23. Kiseleva I.V., Voeten J.T.M., Teley L.C.P., Larionova N.V., Drieszen-van der Cruijsen S.K.M., Basten S.M.C., Heldens J.G.M., van den Bosch H., Rudenko L.G. PB2 and PA genes control the expression of the temperature-sensitive phenotype of cold-adapted B/USSR/60/69 influenza master donor virus. *J. Gen. Virol., 2010, vol. 91, pt 4, pp. 931–937. doi: 10.1099/vir.0.017996-0*
24. Krizanová O., Rathová V. Serum inhibitors of myxoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol., 1969, vol. 4, pp. 125–151. doi: 10.1007/978-3-642-46160-6_6*
25. Kumar A., Meldgaard T.S., Bertholet S. Novel platforms for the development of a universal influenza vaccine. *Front. Immunol., 2018, vol. 9: pp. 600. doi: 10.3389/fimmu.2018.00600*
26. Larionova N., Kiseleva I., Dubrovina I., Bazhenova E., Rudenko L. Peculiarities of reassortment of a cold-adapted influenza a master donor virus with influenza A viruses containing hemagglutinin and neuraminidase of avian H5N1 origin. *Influenza Other Respir. Viruses, 2011, vol. 5, suppl. 1, pp. 346–349.*
27. Larionova N., Kiseleva I., Isakova-Sivak I., Rekstin A., Dubrovina I., Bazhenova E., Ross T.M., Swayne D., Gubareva L., Tsvetnitsky V., Fedorova E., Doroshenko E., Rudenko L. Live attenuated influenza vaccines against highly pathogenic H5N1 avian influenza: development and preclinical characterization. *J. Vaccines Vaccin., 2013, vol. 4, no. 8, pp. 1–11. doi: 10.4172/2157-7560.1000208*
28. Le J., Orff E.J., Fulvini A.A., Huang L., Onodera S., Pokorny B.A., Malewicz A., Primakov P., Bucher D.J. Development of high yield reassortants for influenza type B viruses and analysis of their gene compositions. *Vaccine, 2015, vol. 33, no. 7, pp. 879–884. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.12.027*
29. Looi Q.H., Foo J.B., Lim M.T., Le C.F., Show P.L. How far have we reached in development of effective influenza vaccine? *Int. Rev. Immunol., 2018, vol. 37, no. 5, pp. 266–276. doi: 10.1080/08830185.2018.1500570*
30. Maassab H.F., Bryant M.L. The development of live attenuated cold-adapted influenza virus vaccine for humans. *Rev. Med. Virol., 1999, vol. 9, no. 4, pp. 237–244. doi: 10.1002/(sici)1099-1654(199910/12)9:4<237::aid-rmv252>3.0.co;2-g*
31. Matrosovich M., Gao P., Kawaoka Y. Molecular mechanisms of serum resistance of human influenza H3N2 virus and their involvement in virus adaptation in a new host. *J. Virol., 1998, vol. 72, no. 8, pp. 6373–6380. doi: 10.1128/jvi.72.8.6373-6380.1998*
32. Mohn K.G., Smith I., Sjursen H., Cox R.J. Immune responses after live attenuated influenza vaccination. *Hum. Vaccin. Immunother., 2018, vol. 14, no. 3, pp. 571–578. doi: 10.1080/21645515.2017.1377376*
33. Nakowitsch S., Wolschek M., Morokutti A., Ruthsatz T., Krenn B.M., Ferko B., Ferstl N., Triendl A., Muster T., Egorov A., Romanova J. Mutations affecting the stability of the haemagglutinin molecule impair the immunogenicity of live attenuated

H3N2 intranasal influenza vaccine candidates lacking NS1. *Vaccine, 2011, vol. 29, no. 19, pp. 3517–3524. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.02.100*

34. Neumann G., Watanabe T., Ito H., Watanabe S., Goto H., Gao P., Hughes M., Perez D.R., Donis R., Hoffmann E., Hobom G., Kawaoka Y. Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1999, vol. 96, no. 16, pp. 9345–9350. doi: 10.1073/pnas.96.16.9345*
35. NIBSC. Candidate influenza vaccine viruses. 2022. Accessed 21 January 2023. *URL: https://www.nibsc.org/science_and_research/virology/influenza_resource_/full_reagent_update.aspx*
36. NIBSC. Influenza reagents. 2022. Accessed 21 January 2023. *URL: https://nibsc.org/products/brm_product_catalogue/influenza_reagents.aspx*
37. Rogers G.N., D'Souza B.L. Receptor binding properties of human and animal H1 influenza virus isolates. *Virology, 1989, vol. 173, no. 1, pp. 317–322. doi: 10.1016/0042-6822(89)90249-3*
38. Rogers G.N., Pritchett T.J., Lane J.L., Paulson J.C. Differential sensitivity of human, avian, and equine influenza A viruses to a glycoprotein inhibitor of infection: Selection of receptor specific variants. *Virology, 1983, vol. 131, no. 2, pp. 394–408. doi: 10.1016/0042-6822(83)90507-x*
39. Rota P.A., Wallis T.R., Harmon M.W., Rota J.S., Kendal A.P., Nerome K. Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983. *Virology, 1990, vol. 175, no. 1, pp. 59–68. doi: 10.1016/0042-6822(90)90186-u*
40. Rudenko L., Desheva J., Korovkin S., Mironov A., Rekstin A., Grigorieva E., Donina S., Gambaryan A., Katlinsky A. Safety and immunogenicity of live attenuated influenza reassortant H5 vaccine (phase I-II clinical trials). *Influenza Other Respir. Viruses, 2008, vol. 2, no. 6, pp. 203–209. doi: 10.1111/j.1750-2659.2008.00064.x*
41. Rudenko L., Kiseleva I., Stukova M., Erofeeva M., Naykhin A., Donina S., Larionova N., Pisareva M., Krivitskaya V., Flores J. Clinical testing of pre-pandemic live attenuated A/H5N2 influenza candidate vaccine in adult volunteers: results from a placebo-controlled, randomized double-blind phase I study. *Vaccine, 2015, vol. 33, no. 39, pp. 5110–5117. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.08.019*
42. Rudneva I.A., Timofeeva T.A., Shilov A.A., Kochergin-Nikitsky K.S., Varich N.L., Ilyushina N.A., Gambaryan A.S., Krylov P.S., Kaverin N.V. Effect of gene constellation and postreassortment amino acid change on the phenotypic features of H5 influenza virus reassortants. *Arch. Virol., 2007, vol. 152, no. 6, pp. 1139–1145. doi: 10.1007/s00705-006-0931-8*
43. Ryan-Poirier K.A., Kawaoka Y. Distinct glycoprotein inhibitors of influenza A virus in different animal sera. *J. Virol., 1991, vol. 65, no. 1, pp. 389–395. doi: 10.1128/jvi.65.1.389-395.1991*
44. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science, 1985, vol. 230, no. 4732, pp. 1350–1354. doi: 10.1126/science.2999980*
45. Shcherbik S., Pearce N., Carney P., Bazhenova E., Larionova N., Kiseleva I., Rudenko L., Kumar A., Goldsmith C.S., Dugan V., Stevens J., Wentworth D.E., Bousse T. Evaluation of A(H1N1)Pdm09 LAIV vaccine candidates stability and replication efficiency in primary human nasal epithelial cells. *Vaccine X., 2019, vol. 2: 100031. doi: 10.1016/j.jvacx.2019.100031*
46. Shcherbik S., Pearce N., Kiseleva I., Larionova N., Rudenko L., Xu X., Wentworth D.E., Bousse T. Implementation of new approaches for generating conventional reassortants for live attenuated influenza vaccine based on Russian master donor viruses. *J. Virol. Methods, 2016, vol. 227, pp. 33–39. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.10.009*
47. Shcherbik S.V., Pearce N.C., Levine M.L., Klimov A.I., Villanueva J.M., Bousse T.L. Rapid strategy for screening by pyrosequencing of influenza virus reassortants-candidates for live attenuated vaccines. *PLoS One, 2014, vol. 9, no. 3: e92580. doi: 10.1371/journal.pone.0092580*
48. Singanayagam A., Zambon M., Barclay W.S. Influenza virus with increased pH of hemagglutinin activation has improved replication in cell culture but at the cost of infectivity in human airway epithelium. *J. Virol., 2019, vol. 93, no. 17: e00058–19. doi: 10.1128/jvi.00058-19*
49. Subbarao K., Webster R.G., Kawaoka Y., Murphy B.R. Are there alternative avian influenza viruses for generation of stable attenuated avian-human influenza A reassortant viruses? *Virus Res, 1995, vol. 39, no. 2–3, pp. 105–118. doi: 10.1016/0168-1702(95)00082-8*
50. Taubenberger J.K., Reid A.H., Krafft A.E., Bijwaard K.E., Fanning T.G. Initial genetic characterization of the 1918 Spanish influenza virus. *Science, 1997, vol. 275, no. 5307, pp. 1793–1796. doi: 10.1126/science.275.5307.1793*
51. Trombetta C.M., Ulivieri C., Cox R.J., Remarque E.J., Centi C., Perini D., Piccini G., Rossi S., Marchi S., Montomoli E. Impact of erythrocyte species on assays for influenza serology. *J. Prev. Med. Hyg., 2018, vol. 59, no. 1, pp. E1-E7. doi: 10.15167/2421-4248/jpmh2018.59.1.870*
52. Tumpey T.M., Basler C.F., Aguilar P.V., Zeng H., Solórzano A., Swayne D.E., Cox N.J., Katz J.M., Taubenberger J.K., Palese P., García-Sastre A. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science, 2005, vol. 310, no. 5745, pp. 77–80. doi: 10.1126/science.1119392*
53. Wareing M.D., Marsh G.A., Tannock G.A. Preparation and characterisation of attenuated cold-adapted influenza a reassortants derived from the A/Leningrad/134/17/57 donor strain. *Vaccine, 2002, vol. 20, no. 16, pp. 2082–2090. doi: 10.1016/s0264-410x(02)00056-7*
54. WHO. Availability of two new candidate reassortant vaccine viruses for pandemic (H1N1) 2009 virus vaccine development. 14 September 2009. *URL: https://www.who.int/teams/global-influenza-programme/vaccines/who-recommendations/candidate-vaccine-viruses/docs/default-source/influenza/cvvs/archive-2009/200908-1 (Accessed 21 January 2023)*
55. WHO. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. 2011. *URL: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44518/9789241548090_eng.pdf?sequence=1 (Accessed 4 December 2020)*
56. WHO. Recommendations for the production and control of influenza vaccine (inactivated). Annex 3. TRS No 977. 2013. *URL: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/vaccine-quality/recommendations-for-the-production-and-control-of-influenza-vaccine-(inactivated)b0ed4c58-8154-496d-bf91-624734826500.pdf?sfvrsn=cfcd1432_1&download=true (Accessed 21 January 2023)*

57. WHO. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of influenza vaccines (human, live attenuated) for intranasal administration. Annex 4, TRS No 977. 2013. *URL: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/vaccine-standardization/influenza/trs_977_annex_4.pdf?sfvrsn=92690fd7_3&download=true (Accessed 21 January 2023)*
58. WHO. Vaccines against Influenza: WHO position paper. 2022. *URL: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/354264/WER9719-eng-fre.pdf (Accessed 21 January 2023)*
59. Wolkerstorfer A., Katinger D., Romanova J. Factors affecting the immunogenicity of the live attenuated influenza vaccine produced in continuous cell line. *Microbiology Independent Research Journal, 2016, no. 3, pp. 13–24. doi: 10.18527/2500-2236-2016-3-1-13-24*
60. Wong S.S., Webby R.J. Traditional and new influenza vaccines. *Clin. Microbiol. Rev., 2013, vol. 26, no. 3, pp. 476–492. doi: 10.1128/cmr.00097-12*

Авторы:
Киселева И.В., д.б.н., профессор, зав. лабораторией общей вирусологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;
Руденко Л.Г., д.м.н., профессор, зав. отделом вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:
Kiseleva I.V., DSc (Biology), Professor, Head of the Laboratory of General Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; Professor, Department of Fundamental Problems of Medicine and Medical technologies, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;
Rudenko L.G., DSc (Medicine), Professor, Head of the A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 23.01.2023
Принята к печати 04.03.2023

Received 23.01.2023
Accepted 04.03.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 2, pp. 219–233

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 2, с. 219–233

ПУТИ ЭНДОЦИТОЗА ВИРУСОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ И ПРЕЗЕНТАЦИЯ ПОГЛОЩЕННЫХ АНТИГЕНОВ

В.Ю. Талаев, И.Е. Заиченко, О.Н. Бабайкина, М.В. Светлова, Е.В. Воронина

ФБУН Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия

Резюме. Белки многих вирусов могут собираться в строго организованные структуры — вирусоподобные частицы, которые несут антигены исходных вирусов, а также могут быть искусственно «декорированы» антигенами других возбудителей. Эти частицы не содержат вирусного генома и лишены инфекционности, но могут обладать высокой иммуногенностью и поэтому активно используются для разработки вакцин. Не вызывает сомнения, что при конструировании вакцин необходимо учитывать сведения о взаимодействии их компонентов с иммунной системой, в частности, с антигенпрезентирующими клетками. Особенно важно это для вирусоподобных частиц, поскольку они, подобно другим частицам нанометровых размеров, могут проникать в антигенпрезентирующие клетки с помощью различных путей эндоцитоза. Эти пути используют множество рецепторов, генерируют эндоцитарные везикулы разного размера и, что особенно актуально, ассоциированы с различной судьбой поглощенного материала. В обзоре описаны механизмы фагоцитоза, макропиноцитоза, клатрин-опосредованного эндоцитоза, быстрого эндофилин-опосредованного эндоцитоза и несколько эндоцитарных путей, ассоциированных с липидными рафтами. Приведены данные о связи различных эндоцитарных путей с сортировкой поглощенного груза в ранних эндосомах и ферментативной деградацией содержимого поздних эндосом. Обсуждаются механизмы распределения поглощенных антигенов внутри антигенпрезентирующих клеток для загрузки на молекулы главного комплекса гистосовместимости I и II классов. Представлены данные об эндоцитозе различных вирусов при инфицировании клеток, а также сравнительный анализ путей эндоцитоза вирусоподобных частиц и родственных им вирусов. Отмечается, что вирусоподобные частицы, наряду с путем поглощения, специфичным для исходного вируса, могут использовать дополнительные эндоцитарные пути, а также могут быть искусственно «нацелены» на определенный рецептор и соответствующий ему путь поглощения. Это дает возможность выбора или конструирования частиц с оптимальными показателями эндоцитоза и презентации антигенов для индукции протективного иммунного ответа при вакцинации. Следует предположить, что для большинства профилактических вакцин нужны частицы, которые хорошо поглощаются антигенпрезентирующими клетками и направляют материал на эндолизосомальную деградацию, или частицы, поглощение которых направляет материал как в поздние, так и в статические ранние эндосомы, обеспечивая доступность антигенов для «прямой» и перекрестной антигенной презентации. Наконец, в обзоре обсуждаются вирусоподобные частицы для доставки лекарств или генно-инженерных конструкций и оптимальные эндоцитарные пути, которые должны защищать полезную нагрузку этих частиц от эндолизосомной деградации.

Ключевые слова: *эндоцитоз, рецепторы, презентация антигенов, вирусоподобные частицы, вирусы, вакцины.*

Адрес для переписки:
Талаев Владимир Юрьевич
603950, Россия, Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71,
ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной
Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (831) 469-79-48.
E-mail: talaev@inbox.ru

Contacts:
Vladimir Yu. Talayev
603950, Russian Federation, Nizhny Novgorod, Malaya
Yamskaya str., 71, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod
Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology.
Phone: +7 (831) 469-79-48.
E-mail: talaev@inbox.ru

Для цитирования:
Талаев В.Ю., Заиченко И.Е., Бабайкина О.Н., Светлова М.В., Воронина Е.В. Пути эндоцитоза вирусоподобных частиц и презентация поглощенных антигенов // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 2. С. 219–233. doi: 10.15789/2220-7619-VPE-8045

Citation:
Talayev V.Yu., Zaichenko I.Ye., Babaykina O.N., Svetlova M.V., Voronina E.V. Virus-like particle endocytosis pathways and presentation of captured antigens // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 2, pp. 219–233. doi: 10.15789/2220-7619-VPE-8045

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-VPE-8045

VIRUS-LIKE PARTICLE ENDOCYTOSIS PATHWAYS AND PRESENTATION OF CAPTURED ANTIGENS

Talayev V.Yu., Zaichenko I.Ye., Babaykina O.N., Svetlova M.V., Voronina E.V.

Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Abstract. The proteins of many viruses can be assembled into strictly organized structures — virus-like particles bearing antigens of the original viruses and may also be artificially decorated with antigens of other pathogens. These particles contain no viral genome and lack infectivity but can be highly immunogenic and therefore being actively used for vaccine development. Undoubtedly, while designing vaccines, it is necessary to take into account information about the interaction of vaccine components with immune system particularly antigen-presenting cells. This is especially important for virus-like particles because, like other nanometer-sized particles, they can enter antigen-presenting cells using various endocytosis pathways. The latter exploit multiple receptors, generate endocytic vesicles of different sizes, and, most importantly, are associated with varying fates of captured material. Here we review the mechanisms of phagocytosis, macropinocytosis, clathrin-mediated endocytosis, rapid endophilin-mediated endocytosis, and several endocytic pathways associated with lipid rafts. The data are presented on the relationship between various endocytic pathways and sorting of absorbed cargo in early endosomes as well as enzymatic degradation of the late endosomes contents. We also describe the mechanisms of distribution of absorbed antigens within antigen-presenting cells to be loaded onto the class I and II major histocompatibility complex molecules. The data are presented on the endocytosis of various viruses during cell infection, as well as a comparative analysis of the endocytosis pathways for virus-like particles and related viruses. It has been noted that virus-like particles, along with the absorption pathway specific for parent virus, can rely on additional endocytic pathways to be also artificially "targeted" at the selected endocytic receptor and relevant absorption pathway. It allows to select or design particles with optimal endocytosis and antigen presentation to induce a protective immune response upon vaccination. It should be assumed that most prophylactic vaccines require particles that are well engulfed by antigen presenting cells and direct material to endolysosomal degradation, or particles whose uptake directs material to both late and static early endosomes, making antigens available for «direct» and cross presentations. Finally, we discuss virus-like particles for the delivery of drugs or genetically engineered constructs, as well as optimal endocytic pathways that should protect the payload of these particles from endolysosomal degradation.

Key words: *endocytosis, receptors, presentation of antigens, virus-like particles, viruses, vaccines.*

Введение

Структурные белки многих вирусов обладают способностью самопроизвольно собираться в организованные полимерные структуры — вирусоподобные частицы (ВПЧ), которые несут антигены исходных вирусов, а также могут быть искусственно «декорированы» антигенами других возбудителей. ВПЧ не содержат вирусного генома и лишены инфекционности, но могут индуцировать мощный иммунный ответ. В связи с этим ВПЧ являются перспективной основой для разработки вакцин против многих заболеваний, и некоторые из ВПЧ-вакцин уже доказали свою эффективность [10]. Лицензированы для использования ВПЧ-вакцины против гепатитов В и Е, папилломавирусов человека (HPV), *Plasmodium falciparum* [74, 79, 107] и ветеринарные вакцины против цирковируса свиней [46]. Десятки ВПЧ-вакцин находятся на стадиях разработки или клинических испытаний [2, 74, 79]. Кроме того, ВПЧ можно использовать для доставки внутрь клеток генно-инженерных конструкций или лекарств, а также для исследования взаимодействия вирусов с клетками и оценки действия противовирусных лекарственных средств [1].

Размеры ВПЧ находятся в общем диапазоне размеров вирусов, а их форма может воспроизводить родительские вирионы или субвирусные частицы. Ценным свойством ВПЧ является строгая организация поверхности, состоящей из повторяющихся точно ориентированных элементов [10]. Такая поверхность характерна для структур патогенов (вирусных капсидов, жгутиков бактерий), и иммунная система может распознавать эти повторяющиеся структуры, как своеобразный геометрический паттерн, ассоциированный с патогенами [9]. Так, одинаковые антигенные эпитопы, равномерно распределенные на расстоянии 5–10 нм друг от друга (как в оболочке вируса), вызывают максимальную активацию В-лимфоцитов [9]. Повторяющиеся вирусные поверхности идеальны для многовалентных взаимодействий с IgM и мультимерными компонентами врожденной иммунной системы (C1q, пентраксинами, фиколинами, коллектинами). Они эффективнее активируют комплемент, что также способствует активации В-клеток [10]. Однако мощная активация В-клеток, не подкрепленная помощью Т-хелперов, может привести к быстрой дифференцировке В-клеток в короткоживущие плазмоциты без созревания клеток иммунологической памяти и долгоживущих плазмоцитов. Результатом такого Т-независимого ответа может быть сильная, но краткосрочная продукция антител. Необходимым условием

формирования длительного иммунитета к инфекции является привлечение в иммунный ответ Т-лимфоцитов, за рекрутирование которых отвечают миелоидные антигенпрезентирующие клетки (АПК) — дендритные клетки (ДК) и макрофаги. Эти АПК эффективно собирают, процессируют и представляют антигенный материал на молекулах главного комплекса гистосовместимости (МНС). Также функцию АПК могут выполнять В-клетки и Т-лимфоциты с γ/δ Т-клеточным рецептором (TCR) [102, 108], а в очаге воспаления — эпителиальные и эндотелиальные клетки.

АПК используют различные способы поглощения внеклеточного материала, причем многие из них могут участвовать в эндоцитозе ВПЧ. Однако разные пути эндоцитоза реализуются с использованием различных рецепторов и генерируют эндоцитарные везикулы разного размера, что может оказывать существенное влияние на поглощение различных ВПЧ. Некоторые эндоцитарные рецепторы при инфекции используются вирусами для проникновения в клетки. Следует ожидать, что наличие в структуре ВПЧ вирусных лигандов этих эндоцитарных рецепторов индуцирует поглощение частиц клетками-носителями рецепторов. Определенное влияние на фармакокинетику ВПЧ могут оказать эндоцитарные механизмы, вовлеченные в трансцитоз через эпителиальные и эндотелиальные барьеры. Наконец, разные пути эндоцитоза ассоциированы с различной судьбой поглощенного материала, что может влиять на эффективность загрузки антигенов на МНС. В обзоре приведены сведения о механизмах эндоцитоза и презентации антигенов, а также данные о реализации эндоцитарных механизмов при поглощении вирусов и ВПЧ.

Фагоцитоз

Традиционно описание поглощения микробного материала начинают с фагоцитоза, который используют профессиональные фагоциты: нейтрофилы, макрофаги, ДК [53, 93] и γ/δTCR+ Т-клетки [102, 108]. Однако фагоцитоз наиболее эффективен при поглощении относительно крупных корпускулярных объектов с оптимальным размером от 0,5 до 3 мкм [48, 56], что существенно превышает размер большинства ВПЧ. Фагоцитоз частиц с нанометровыми размерами также возможен, но он, по-видимому, требует агрегации или опсонизации [96], что свидетельствует о роли фагоцитарных рецепторов в поглощении мелких объектов. К фагоцитарным рецепторам относятся рецепторы опсонинов, мембранные лектины С-типа (CD205/DEC-205, CD206/маннозный рецептор, CD209/DC-SIGN), рецепторы белков теплового шока, рецептор-мусорщик CD204 [31, 44, 95]. В соответствии со специфичностью этих рецепторов, следует ожидать, что характер гликозилирования также влияет на фагоцитоз мелких частиц.

Фагоцитоз эффективно запускается при контакте клетки с выступающей частью плотного объекта с большой кривизной, например с острым концом эллипсоида [24]. Активация фагоцитарных рецепторов в месте первичного контакта инициирует сборку актиновой сети в виде чаши под мембраной. Затем актиновая чаша трансформируется в кольцо, которое продвигается вдоль объекта фагоцитоза внутри растущих выступов плазматической мембраны, до тех пор, пока объект не будет заключен в мембранную структуру — фагосому. Сформированная фагосома отпочковывается от плазматической мембраны и продвигается внутрь клетки, вступая во временные контакты с эндосомами и сливаясь с лизосомами. При этом среда внутри фаголизосомы закисляется, и поглощенный материал подвергается инактивации и расщеплению лизосомальными ферментами. Интересно, что фагоцитоз и бактерицидная активность макрофагов усиливается от притока в клетку ионов Ca^{2+} через механически активируемые ионные каналы Piezo1 [40]. Эти каналы активируются при механическом воздействии на мембрану клетки [30], при контакте макрофага с внеклеточным матриксом достаточной жесткости, а также участвуют в передаче сигнала от паттерн-распознающего Toll-подобного рецептора 4 (TLR4) [40]. Таким образом, на уровне механосенсоров может происходить взаимодействие управляющих фагоцитозом сигналов, генерируемых механическим воздействием и молекулярным паттерном патогена.

Судьба материала, поглощенного с помощью фагоцитоза и других вариантов эндоцитоза; презентация антигенов

Нейтрофилы для инактивации поглощенных микроорганизмов используют чрезвычайно агрессивные агенты, в первую очередь, активные формы кислорода (АФК), тогда как макрофаги и, особенно, ДК уничтожают микроорганизмы за счет ферментативной деградации при относительно слабой продукции АФК [38]. Кроме того, среда в фаголизосомах ДК менее кислая, чем у макрофагов и нейтрофилов, набор ферментов разнообразен [57], но их концентрации невелики [35], а активность протеаз ограничена присутствием ингибиторов [47]. В результате ДК расщепляют поглощенные белки с сохранением относительно больших фраг-

ментов, в том числе, Т-клеточных эпитопов — последовательностей, обладающих антигенной специфичностью и способностью эффективно связываться с молекулами МНС [93]. Благодаря этим свойствам, а также способности обеспечивать Т-клетки дополнительными стимулирующими сигналами, ДК являются наиболее активными АПК, критически необходимыми для запуска первичного Т-зависимого иммунного ответа. Наконец, ДК обладают еще одним свойством, расширяющим возможности представления поглощенных антигенов Т-лимфоцитам, а именно, способностью к перекрестной презентации. Следует отметить, что способностью к перекрестной презентации обладают разные типы АПК [21, 56], однако наиболее эффективно этот процесс использует специализированная группа ДК — классические или обычные (conventional) ДК типа 1 (кДК1) [11].

Суть перекрестной презентации состоит в следующем. Как известно, антигенные пептиды, представленные на МНС II (МНС II) распознаются $CD4^+$ Т-клетками (в частности, Т-хелперами), а пептиды на МНС I — $CD8^+$ Т-клетками (цитотоксическими Т-лимфоцитами). МНС II экспрессируются на АПК и экспонируют фрагменты белков, поглощенных с помощью эндоцитоза. МНС I экспрессируются практически на всех клетках организма и на большинстве клеточных типов презентируют фрагменты белков, синтезированных исключительно внутри клетки. Иными словами, клетка может презентировать вирусные антигены $CD8^+$ Т-лимфоциту только в случае заражения вирусом данной клетки, но не в случае эндоцитоза вирусных белков извне. Однако перекрестно-презентирующие АПК могут не только представлять поглощенные извне антигены на МНС II, но и перераспределять часть этих антигенов на МНС I, в результате чего эндоцитированные антигены становятся доступными как для Т-хелперов, так и для $CD8^+$ Т-клеток.

Местом загрузки антигенных пептидов на МНС II являются компартменты эндолизосомального пути расщепления поглощенного материала (фагосомы/фаголизосомы, макропиносомы, поздние эндосомы). Канонической зоной загрузки МНС I является эндоплазматический ретикулум, куда из цитозоля транспортируются пептиды, образовавшиеся при работе протеосом — мультимолекулярных комплексов для расщепления ненужных или дефектных белков. При альтернативных способах загрузки МНС I, лежащих в основе перекрестной презентации, происходит перераспределение поглощенных извне антигенов на МНС I по двум принципиально различным путям — вакуолярному и цитозольному. В вакуолярном пути антигены загружаются на МНС I непосредственно в фагосомах [11], то есть там же, где происходит загрузка на МНС II. Детали этого процесса обсуждаются, однако присутствие МНС I в фагосомах доказано, и может объясняться либо захватом этих молекул с наружной мембраны в зоне образования фагоцитарной чаши, либо транспортом из эндоплазматического ретикулума в везикулах [28], которые сливаются с мембраной растущей фагосомы и увеличивают ее площадь при «натягивании» на объект [58]. Следует отметить, что вакуолярный путь перераспределения антигена реализуется макрофагами при фагоцитозе, тогда как ДК, по-видимому, преимущественно используют цитозольный путь, ассоциированный не только с фагоцитозом, но и с другими механизмами эндоцитоза, которые будут описаны ниже [105]. В цитозольном пути антигены переносятся из фагосомы в цитозоль, гидролизуются протеасомами, и полученные пептиды транспортируются по каноническому маршруту к молекулам МНС I в эндоплазматический ретикулум [28]. Как осуществляется выход антигенов из фагосомы до конца не ясно, но обсуждаются две группы механизмов — перенос с помощью специализированного мембранного канала или разрыв части фагосом из-за перекисного окисления липидов мембран под действием АФК [28].

Как уже было отмечено, уход поглощенного материала с эндолизосомального пути деградации наблюдается не только при фагоцитозе, но и при других способах эндоцитоза. Более того, специфические пути эндоцитоза веществ, необходимых для клетки (см. ниже), обязательно включают в себя выведение полезного материала с эндолизосомального пути для его защиты от разрушения. Это выведение происходит после слияния эндоцитарных везикул со специализированными мембранными органеллами — ранними эндосомами, функция которых заключается в сортировке поглощенного материала и направлении полезных грузов в соответствующие компартменты клетки с помощью везикул и тубулярных структур. Затем среда в ранней эндосоме начинает закисляться, и эта органелла превращается в позднюю эндосому, сливается с лизосомой, а оставшийся в ней материал подвергается ферментативной деградации. Наряду с полезными грузами выход с эндолизосомального пути осуществляют вирусы для сохранения своего генома и последующей репликации. Точное место «побега» с эндолизосомального пути для многих вирусов неизвестно, однако для вируса гриппа А, реовирусов, аденоассоциированного вируса, полиомавирусов, риновирусов и вируса Зика установлено, что эвакуация из эндосомы зависит от закисления среды и часто требует действия

ферментов на структурные белки вириона, что происходит при созревании ранней эндосомы в позднюю [14, 33, 36, 43, 81]. Поскольку некоторые вирусы могут выходить из эндосомы в виде целого вириона или субвирионных частиц, утративших лишь часть структурных белков, следует предположить, что ВПЧ, воспроизводящие структуру таких вирусов, также могут использовать вирусные механизмы «побега» и покидать эндолизосомальный путь в виде целых или фрагментированных частиц. Однако ВПЧ не инфекционны, и их выход из эндосомы приведет к деградации ненужных клетке вирусных белков в протеасомах и загрузке пептидов на МНС I, тогда как сохранение ВПЧ в эндосомах вплоть до их созревания и слияния с лизосомами приведет к расщеплению ферментами и загрузке пептидов на МНС II.

Следует учесть, что уход чужеродных объектов с эндолизосомального пути ведет к большим потерям антигенного материала, поскольку пептиды, образованные в протеасомах, быстро разрушаются до аминокислот цитозольными пептидазами, и лишь малая часть пептидов успевает загрузиться на МНС I [84]. В связи с этим предполагается, что эффективная презентация эндоцитированных антигенов на МНС I может происходить лишь при поглощении клеткой большого количества антигенного материала. Тем не менее при использовании ВПЧ для избирательной индукции клеточного цитотоксического ответа уход от эндолизосомального пути деградации может дать положительный результат. Так, псевдотипирование ВПЧ вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) гликопротеинами вируса везикулярного стоматита усиливало рекрутирование $CD8^+$ Т-клеток в цитотоксический ответ на антигены ВИЧ за счет расширения спектра АПК и усиления эндоцитоза, а также за счет направления ВПЧ из эндосом в цитоплазму. В результате облегчалось взаимодействие вирусных белков с протеасомой и ассоциация пептидов с МНС I [22, 63]. Уход с эндолизосомального пути также необходим для ВПЧ, которые планируется использовать для доставки внутрь клеток генно-инженерных конструкций или лекарственных средств, которые могут быть разрушены лизосомальными ферментами. В то же время для ВПЧ, которые планируется использовать в вакцинах для предотвращения большинства инфекций, уход антигенного материала с эндолизосомального пути представляется невыгодным, поскольку он может ослабить рекрутирование Т-хелперов, необходимых для формирования полноценного гуморального и клеточного иммунного ответа и иммунологической памяти.

Интересно, что в ходе эндоцитоза формируются пулы ранних эндосом с различной динамикой созревания. При этом стабильные ранние эндосомы могут длительно сохранять и сортировать поглощенный материал в нейтральной среде, тогда как другие эндосомы быстро закисляют среду и сливаются с лизосомами. Выбор груза для этих двух пулов эндосом происходит уже на плазматической мембране и, вероятно, связан с ассоциацией фагоцитарного/эндоцитарного рецептора с адапторными белками. Анализ, проведенный Burgdorf и Kurts показал, что грузы, фагоцитированные АПК мыши с помощью маннозного рецептора CD206 и лангерина/CD207, ассоциированы с ранними эндосомами, что, по мнению авторов, способствует перекрестной презентации. Фагоцитоз с помощью рецепторов CD209/DC-SIGN, CD205/DEC-205, DCIR2, дектина-1, MGL (macrophage galactose-type lectin) и рецепторов-мусорщиков направляет материал по эндолизосомальному пути, что должно приводить к преимущественной презентации антигенов на МНС II [21]. В связи с этим данные о взаимодействии ВПЧ с фагоцитарными рецепторами могут быть полезны для прогнозирования способа презентации антигенов, однако на сегодняшний день эти данные немногочисленны. Известно, что ВПЧ из белка L1 папилломавируса человека 16 (HPV-16) взаимодействуют с гепарансульфатом синдекана-3 на ДК и лангерином на клетках Лангерганса [19, 103], тогда как ВПЧ из белка L1 HPV-16 и белка L2 бычьего папилломавируса связываются рецептором DC-SIGN [4]. ВПЧ из белка gag ВИЧ-1 связываются с DC-SIGN [98], а химерные ВПЧ аденовируса человека типа 3, декорированные доменом RBD вируса SARS-CoV-2, связываются с DC-SIGN и MGL [15].

Макропиноцитоз

Для активного сбора антигенов ДК используют еще один процесс, зависящий от быстрого ремоделирования мембраны — макропиноцитоз [80]. При макропиноцитозе перестройки актинового цитоскелета формируют складки мембраны на поверхности клетки, которые смыкаются, захватывают жидкость и взвешенные в ней частицы и образуют крупные везикулы размером от 0,5 до 10 мкм — макропиносомы. В АПК этот тип эндоцитоза направляет поглощенный материал преимущественно на эндолизосомальную деградацию: среда в макропиносомах закисляется, они сливаются с поздними эндосомами и лизосомами, поглощенные белки разрушаются ферментами до пептидов, которые загружаются на МНС II.

С помощью макропиноцитоза внутрь клеток могут проникать некоторые вирусы, причем этот путь является основным способом

заражения клеток крупными вирусами, такими как вирус Эбола и вирус оспавакцины (табл.). ВПЧ, воспроизводящие вирус Эбола, также поглощаются с помощью макропиноцитоза [75]. Интересно, что макропиноцитоз может зависеть от состава вириона, хотя ранее эта форма эндоцитоза представлялась процессом неспецифического поглощения жидкости и взвешенных в ней частиц. Так, введение в состав вируса везикулярного стоматита гликопротеинов вируса Эбола индуцирует макропиноцитоз полученных псевдотипированных вирионов [75]. Определенная зависимость макропиноцитоза от свойств поглощаемого материала может быть связана со стимуляцией этого процесса паттерн-распознающими рецепторами. Так, у незрелых ДК макропиноцитоз идет конститутивно, однако при распознавании патогена рецепторами TLR2 или TLR4 макропиноцитоз активизируется, а подвижность клеток временно ограничивается, что позволяет ДК в течение нескольких часов собрать в инфицированной ткани большое количество разнообразного материала и лишь затем мигрировать в региональный лимфоидный орган для презентации собранных антигенов [100].

Клатрин-опосредованный эндоцитоз (КОЭ)

КОЭ является наиболее универсальным способом эндоцитоза и в физиологических условиях используется любыми эукариотическими клетками для связывания и транспортировки внутрь клеток необходимых веществ — метаболитов или гормонов с помощью специфических эндоцитарных рецепторов. Кроме того, КОЭ применяется для интернализации связавших лиганд сигнальных рецепторов с целью выключения сигнала и разрушения рецептора или его очистки от лиганда и возвращения на мембрану. У В-лимфоцитов КОЭ используется для интернализации связавших антиген В-клеточных рецепторов (BCR) и является основным способом сбора антигенов этим типом АПК [58, 88]. Интересно, что Т-лимфоциты интернализуют α/β TCR с помощью КОЭ в ходе постоянного рециклинга не связанных с антигеном TCR, тогда как после взаимодействия с комплексом антиген–МНС TCR поглощается с использованием клатрин-независимых механизмов [25].

Для запуска КОЭ эндоцитарные рецепторы должны связать лиганд, после чего их цитоплазматические участки рекрутируют адапторные белки и тримеры клатрина, имеющие характерную форму трискелиона. Тримеры клатрина полимеризуются, группируя нагруженные рецепторы на определенном участке плазматической мембраны и образуя под этим участком клатриновую сеть, которая привлекает индукторы искривления: эпсины и белки с доменом BAR. При этом клатриновая сеть выгибается внутрь клетки, увлекая с собой мембрану, рецепторы и связанные с ними лиганды. В результате формируется покрытая клатрином ямка, которая по мере прогибания мембраны превращается в шарообразную полость диаметром около 100–150 нм. Затем происходит рекрутирование и полимеризация динамина-2 в спираль, которая стягивает шейку полости и отделяет покрытую клатрином везикулу от наружной мембраны клетки. Клатрин диссоциирует от везикулы, и она сливается с ранней эндосомой, которая осуществляет сортировку поглощенного материала. Затем среда в ранней эндосоме начнет закисляться, она превратиться в позднюю эндосому и оставшийся в ней материал подвергается эндолизосомальной деградации [58]. Ассоциация КОЭ с сортировкой материала в ранних эндосомах и постепенное превращение ранних эндосом в поздние представляет возможность для «побега» с эндолизосомального пути деградации. Возможно, поэтому КОЭ является самым распространенным путем проникновения в клетки вирусов, которые в ходе эволюции приобрели способность взаимодействовать с эндоцитарными рецепторами [71]. В частности, вирусы гриппа, гепатита В, гепатита С, SARS-CoV-2, HPV-16, аденовирусы, герпесвирусы используют КОЭ для заражения клеток (табл.).

Быстрый эндофилин-опосредованный эндоцитоз (БЭОЭ)

КОЭ является относительно медленным процессом. Для интернализации большого количества рецепторов (более миллиона копий) с помощью КОЭ клетке требуется около 30 мин, и для ускорения поглощения необходим запуск дополнительных механизмов [86]. Так, при росте количества BCR, связавших антиген, В-клетки модифицируют КОЭ в несколько раз увеличивая размер покрытых клатрином ямок. Для превращения таких крупных участков мембраны в везикулу требуется раннее участие актина, тогда как при классическом КОЭ актин используется только для продвижения сформированной везикулы внутрь клетки [88]. Другие клетки могут проводить более радикальную смену механизмов эндоцитоза, как, например, эпителиальные клетки при росте концентрации эпидермального фактора роста (EGF). При низких концентрациях EGF его рецептор интернализуется КОЭ, при повышенной концентрации — неклатриновым эндоцитозом рецептора EGF с острым ремоделированием мембраны и активацией динамина. Наконец,

Таблица. Эндоцитарные пути проникновения вирусов в клетки человека
Table. Endocytic pathways of virus entry into human cells

Вирусы Viruses	**Размер вириона (нм)** Virion size (nm)	**Пути эндоцитоза** Pathways of endocytosis		
		Макропиноцитоз Macropinocytosis	**КОЭ** Clathrin-mediated endocytosis	**Клатрин-независимые пути** Clathrin-independent pathways
Вирусы с липидной оболочкой Lipid-enveloped viruses				
Хантавирусы Hantaviruses	228–5051	+ [72]	+ [72]	
Эболавирус Ebolavirus	80×1400	+ [75, 91]		
Вирус коровьей оспы Vaccinia virus	200×300	+ [70]		
Вирус кори (основной путь — слияние с мембраной клетки) Measles virus (the major pathway is via fusion with cell membrane)	150–250	+ [41]		**RhoA-ROCK-миозин II-зависимый путь [41]** RhoA-ROCK-myosin II-dependent pathway
Вирус простого герпеса Herpes simplex virus	185–225			**Путь Arf6 [77]** Arf6 pathway
Герпесвирус, тип 8 Herpesvirus type 8	185–225	+ [83]	+ [5]	
Вирус везикулярного стоматита Vesicular stomatitis virus	80×200		+ [65]	
SARS-CoV-2	50–200		+ [7]	
Вирус гриппа А Influenza A virus	100–120		+ [64, 90]	
Вирус гепатита С Hepatitis C virus	40–60		+ [16, 67]	
Вирус денге 2 Dengue virus 2	40–60		+ [3]	
Вирус Зика Zika virus	40–60		+ [4, 81]	
Вирус гепатита В Hepatitis B virus	30–42		+[46, 50, 52]	**Кавеолы [59]** Caveolae
Простые вирусы Non-enveloped viruses				
Аденовирус, тип 2 и 5 Adenovirus type 2 and 5	70–90	+ [68, 69]	+ [68, 69]	
Аденовирус, тип 3 Adenovirus type 3	70–90	+ [8]		
Ротавирус Rotavirus	76		+ [33]	**Путь IL-2Rβ [92]** IL-2Rβ pathway
HPV, тип 16 HPV type 16	55		+ [34]	
Полиомавирус 2 (JC) Poliomavirus 2 (JC)	40–50		+ [66]	
Полиомавирус клеток Меркеля Merkel cell polyomavirus	40–50			**Кавеолы/липидные рафты [14]** Caveolae/lipid rafts
SV40	40–50			**Кавеолы [82, 97]** Caveolae **CLIC-GEEC [32]**
Вирус гепатита Е Hepatitis E virus	32–34		+ [51]	
Вирус Коксаки А9 Coxsackievirus A9	20–30			**Путь Arf6 [49]** Arf6 pathway

Окончание таблицы. Эндоцитарные пути проникновения вирусов в клетки человека
Table. Endocytic pathways of virus entry into human cells (continued)

Вирусы Viruses	**Размер вириона (нм)** Virion size (nm)	**Пути эндоцитоза** Pathways of endocytosis		
		Макропиноцитоз Macropinocytosis	**КОЭ** Clathrin-mediated endocytosis	**Клатрин-независимые пути** Clathrin-independent pathways
Вирус Коксаки B3 Coxsackievirus B3	20–30		+ [27]	**Путь Arf6 [61]** Arf6 pathway
Эховирус-1 Echovirus-1	20–30			**Кавеолы [62]** Caveolae
Энтеровирус-71 Enterovirus-71	20–30			**БЭОЭ [26]** rapid endophilin-mediated endocytosis
Риновирус человека 14 Human rhinovirus 14	20–30		+ [43]	
Аденоассоциированный вирус, тип 2 и 5 Adenoassociated virus type 2 and 5	20		+ [12, 13, 37]	**CLIC-GEEC [78]**

при чрезвычайно высоких концентрациях этого потенциально онкогенного фактора экстренный клиренс его рецептора с поверхности осуществляется с помощью макропиноцитоза и БЭОЭ [86].

БЭОЭ, также как и КОЭ, зависит от взаимодействия интернализуемого рецептора с лигандом, а формирование эндосомальной везикулы осуществляется за счет изгибания мембраны специализированным цитозольным белком, в данном случае — индуктором искривления эндофилином [18]. Однако, в отличие от клатрина, эндофилин обогащает отдельные участки под наружной мембраной еще до взаимодействия рецептора с лигандом за счет активного перераспределения между короткоживущими (5–10 с) «эндофилиновыми пятнами». Активация рецептора лигандом инициирует связывание эндофилина с цитоплазматическим участком рецептора (непосредственно или через адапторные белки), что вызывает кластеризацию активированных рецепторов и группировку их грузов на локальном участке мембраны, который втягивается в клетку и образует глубокую полость (везикулярно-тубулярную сборку) размером 0,1–1 мкм, которая с цитоплазматической стороны окружена эндофилином и белком Bin1. Почкование этой везикулы требует полимеризации динамина и актина, а ее продвижение внутрь клетки вдоль микротрубочек осуществляется с помощью молекулярного мотора динеина, который рекрутируется белком Bin1 [86].

В физиологических условиях БЭОЭ участвует в интернализации питательных веществ и цитокинов, в частности, IL-2 [18], а также обеспечивает поглощение и перераспределение участков мембраны при движении или поляризации клетки [94]. Следует отметить, что β-цепь рецептора IL-2 (IL-2Rβ) может быть интернализована по своему уникальному пути, родственному макропиноцитозу и требующему активности малой ГТФ-азы RhoA [86]. При инфекциях БЭОЭ может быть вовлечен в отравление клеток бактериальными токсинами (холерным токсином и токсином Шига) и в заражение энтеровирусами, тогда как путь IL-2Rβ может обеспечивать проникновение в клетку ротавирусов (табл.).

Клатрин-независимые пути эндоцитоза, опосредованные липидными рафтами

Еще одна группа эндоцитарных механизмов описывается концепцией «гликолипид–лектин», согласно которой сшивание интегрированных в мембрану гликолипидов или гликопротеинов внеклеточными лектинами создает локальное напряжение в мембране, которое разрешается спонтанной тубуляцией. Иными словами, лектины с внешней стороны плазматической мембраны сшивают заякоренные в мембране молекулы и «заворачивают мембрану на себя», что ведет к формированию трубчатых эндоцитарных ямок, а затем — везикул. Одним из вариантов такого механизма является эндоцитарный путь CLIC/GEEC, в ходе которого формируются мелкие (50–80 нм) трубчатые или серповидные везикулы — клатрин-независимые переносчики (CLIC), которые затем сливаются друг с другом и созревают в ранние эндоцитарные компартменты, обогащенные гликозидфосфатидилинозитол-заякоренными белками (GEEC) [94].

В норме CLIC/GEEC транспортируют в клетку лектины галлектин-3 и -8, интернализуют белки, закрепленные с наружной стороны

мембраны гликозидфосфатидилинозитольным якорем (CD55, CD59, CD90/Thy-1), а также трансмембранные гликопротеины (рецептор фолиевой кислоты и CD44). Кроме того, CLIC/GEEC участвуют в захвате значительного объема жидкости и в перераспределении поглощенных участков наружной мембраны при движении клеток и морфогенезе органов. Наконец, этот путь эндоцитоза используют некоторые вирусы, в частности, аденоассоциированный вирус 2 и вирус SV40 (обезьяний вирус) (табл.). Судьба материала, поглощенного с помощью CLIC/GEEC, определяется в ходе сортировки в ранних эндосомах и зависит от степени гликозилирования и взаимодействия с галектином. Поскольку путь CLIC/GEEC чувствителен к истощению запасов холестерина, а гликозидфосфатидилинозитол-заякоренные белки располагаются в липидных рафтах, предполагается, что везикулы CLIC формируются из этих особых участков плазмалеммы [58].

Липидные рафты используются клетками при реализации еще нескольких путей эндоцитоза. Наиболее известным является эндоцитоз с помощью кавеол — липидных рафтов специфической вогнутой колбообразной формы размером 50–100 нм. Ключевую роль в формировании этих структур играет белок кавеолин-1, интегрированный в цитоплазматическую поверхность кавеолы. При биогенезе кавеол кавеолин-1 олигомеризуется в эндоплазматическом ретикулуме и переносится в аппарат Гольджи для мультимеризации на участке мембраны, который обогащается холестерином. Этот предшественник липидного рафта затем транспортируется к плазматической мембране в виде небольших везикул, которые открываются наружу и интегрируют в свою мембрану другие липиды и белки, в частности, кавины. С помощью кавеол осуществляется транспорт различных веществ [76], включая трансцитоз — сквозной перенос веществ через эндотелиальные или эпителиальные клетки [89], а также поглощение некоторых мелких вирусов (табл.).

Кавеолы были впервые обнаружены у эндотелиальных, эпителиальных и мышечных клеток, а также у адипоцитов и фибробластов, а затем появились сообщения об использовании этого механизма при поглощении наноразмерных объектов другими клетками, включая ДК. Например, сообщалось, что наноструктура, собранная посредством электростатического взаимодействия катионного пептидного антигена и анионного polyIC (агонист TLR3, играющий роль адъюванта), поглощается $CD11c^+$ ДК мыши с помощью кавеол, причем около 40% поглощенного материала направляется по эндолизосомальному пути, что свидетельствует о принципиальной возможности презентации собранных антигенов на MHC II [17]. Однако в экспериментах с поглощением частиц разного размера эпителиальными и эндотелиальными клетками переход к кавеолярному пути эндоцитоза сопровождался утратой ассоциации поглощенного материала с эндолизосомальным путем деградации [42, 85]. Таким образом, судьба груза, поглощенного кавеолами, может быть различной и, возможно, зависит от типа клетки или характера поглощаемого груза [58].

Следует отметить, что в некоторых работах [17, 85] кавеолярный тип эндоцитоза идентифицируют только с помощью ингибитора филиппина, который связывает холестерин. По нашему мнению этого недостаточно для точной идентификации кавеолярного типа поглощения, поскольку истощение холестерина может влиять на другие пути эндоцитоза, ассоциированные с липидными рафтами. Выше уже упоминалось, что с рафтами ассоциированы CLIC/GEEC. Кроме того, плоские липидные рафты могут быть вовлечены в эндоцитоз по флотиллин-зависимому пути и по Arf6-зависимому пути. Везикулы, сформированные с участием флотиллина, сливаются с поздними эндосомами и направляют поглощенный материал на деградацию по эндолизосомальному пути, тогда как путь Arf6 ведет к сортировке поглощенного материала и рециклированию мембраны обратно на клеточную поверхность [58]. В связи с этим Arf6-зависимый эндоцитоз служит безопасными входными воротами для некоторых вирусов (табл.).

Пути эндоцитоза частиц с различными размерами

Приведенный выше перечень путей эндоцитоза является неполным (в него не включены пути поглощения нейромедиаторов), однако со всей очевидностью свидетельствует о том, что эволюция поддержала множество механизмов, позволяющих эффективно поглощать и сортировать различные грузы в зависимости от их химических свойств и размеров. Химические свойства поверхности частиц определяют взаимодействие с тем или иным рецептором, связанным с конкретным путем поглощения. Что касается размеров поглощаемых объектов, то связь микрометровых размеров с фагоцитозом и макропиноцитозом не вызывает сомнений. Весьма заманчивым представляется предположение о том, что другие пути эндоцитоза используются клеткой для сортировки нанометровых объектов по размеру, однако данные об оптимальном размере частиц для этих путей противоречивы. Так, в работе Wang с соавт. [99] у эндотелиальных клеток оптимальным для кавеол был диаметр < 40 нм, причем в одну каве-

олу помещалось до трех частиц размером 20 нм или до двух частиц размером 40 нм. В исследовании Rejman с соавт. [85] микросферы с диаметром < 200 нм эффективно поглощались с помощью КОЭ, тогда как увеличение диаметра до 500 нм направляло материал по пути, чувствительному к филиппину, который авторы (возможно, не вполне корректно) определяют как кавеолярный. В работе Grosse с соавт. [42] эпителиальные клетки дыхательных путей поглощали комплексы ДНК с полимерными носителями размером ≤ 100 нм с помощью кавеол, частицы с размером 100–200 нм — с помощью КОЭ, а частицы с диаметром > 200 нм — с помощью макропиноцитоза. При поглощении вирусов наиболее распространенным и универсальным способом эндоцитоза является КОЭ, макропиноцитоз характерен для крупных вирусов, а CLIC/GEEC и кавеолярный путь — для самых мелких вирусов (табл.).

Пути эндоцитоза ВПЧ

ВПЧ часто используют путь поглощения исходного вируса, однако могут иметь большую свободу выбора путей эндоцитоза в зависимости от конкретных условий. Так, основным путем поглощения вируса HPV-16 является КОЭ (табл.), и ВПЧ этого вируса также могут поглощаться клетками Лангерганса и ДК с помощью КОЭ [19]. Однако в других экспериментальных условиях [103] ДК поглощали эти ВПЧ с помощью фагоцитоза и макропиноцитоза, а клетки Лангерганса — с помощью кавеол. При этом, как ДК, так и клетки Лангерганса были способны перекрестно презентировать антигены этих ВПЧ. Смена типа вируса также может изменять путь эндоцитоза. Так, в одних и тех же условиях ВПЧ HPV-16 и HPV-58 поглощались с помощью КОЭ, а ВПЧ HPV-31 — с помощью рафт-ассоциированного эндоцитоза [20].

Крупные ВПЧ вируса Эбола с диаметром около 80 нм и длиной до 2 мкм, так же как и настоящие вирионы, поглощаются с помощью макропиноцитоза [75]. Однако небольшое количество этих ВПЧ может проникать в клетки за счет КОЭ, что, возможно, объясняется гетерогенностью ВПЧ или модификацией процесса КОЭ [6].

Различные полиомавирусы человека поглощаются с помощью кавеол или КОЭ (табл.). ВПЧ полиомавируса мыши, так же как и исходный вирус, поглощаются фибробластами и эпителиальными клетками и транспортируются в перинуклеарную зону с помощью кавеол [87].

Вирус гепатита В проникает в клетки с помощью КОЭ, а также может транспортироваться в кавеолах (табл.). ВПЧ из корового белка HBcAg, воспроизводящие нуклеокапсид вируса, взаимодействуют с сульфатированными гепарансульфатными протеогликанами на различных типах клеток, включая макрофаги и В-лимфоциты, поглощаются с помощью КОЭ и подвергаются расщеплению по эндолизосомальному пути [29]. ВПЧ, состоящие из малого белка оболочки вируса гепатита В, подавляют функцию плазмоцитоидных ДК, но поглощаются классическими ДК и могут доставлять антиген на молекулы МНС II, а в субпопуляции кДК1 — вызывать еще и перекрестную презентацию антигена на МНС I [73]. Вирус гепатита С также проникает в клетки с помощью КОЭ. Этот вирус обладает липидной оболочкой, но в сыворотке инфицированных пациентов обнаруживаются голые нуклеокапсиды. ВПЧ, воспроизводящие эти субвирусные структуры, вызывают сильный иммунный ответ. В клетках печени эти ВПЧ интернализуются КОЭ, достигая ранних и поздних эндосом и, наконец, лизосом [55]. Нативные вирионы и ВПЧ вируса гепатита Е проникают в клетки с помощью КОЭ [54].

Вирус гриппа А проникает в клетки клатрин-зависимым путем (табл.), тогда как ВПЧ вируса гриппа А поглощаются не только с помощью КОЭ, но и посредством клатрин-независимого эндоцитоза, а также макропиноцитоза и фагоцитоза [60]. Эти ВПЧ получали экспрессией гемагглютинина (ГА) гриппа в *Nicotiana benthamiana*. Они состояли из липидной оболочки размером ~100 нм, в которую было интегрировано 30–50 «шипов» гомотримерного ГА. Через 45 мин после начала поглощения частиц ГА локализовывался внутри клеток вместе с Rab5 (маркер ранних эндосом), Rab7 (маркер поздних эндосом), Rab11 (маркер рециклирующих эндосом), а также МНС II и МНС I. Это свидетельствует о разнообразии путей поглощения ВПЧ, направлении антигенного материала как в поздние, так и в статические ранние эндосомы и его доступности для «прямой» и перекрестной антигенной презентации, что представляется полезным для ВПЧ-вакцин.

Применение ВПЧ для доставки внутрь клеток лекарств или генно-инженерных конструкций предъявляет иные требования к эндоцитозу, а именно: 1) избирательность поглощения ВПЧ клетками — мишенями лечебного воздействия; 2) использование эндоцитарного пути, защищающего материал от эндолизосомальной деградации. Разработка таких векторов может осуществляться с помощью выбора ВПЧ, которые соответствуют этим требованиям, или с помощью искусственного «нацеливания» ВПЧ на определенные эндоцитарные рецепторы. Так, для целевой доставки цитостатиков ВПЧ полиомавируса мыши «нацеливали» на рецептор трансферрина, который может

сильно экспрессироваться на раковых клетках. Поскольку поглощение трансферрина осуществляется с помощью КОЭ, то и ВПЧ, конъюгированные с трансферрином, проникали в клетки-мишени клатрин-зависимым путем, который не используется родительским вирусом [106]. Пример подбора ВПЧ-вектора, не требующего искусственного «нацеливания», приведен в работе Caulier B. и соавт. [23], где в качестве потенциального вектора доставки цитостатика в клетки острого миелоидного лейкоза использовали мелкие (30 нм) ВПЧ, имеющие форму додекаэдра и состоящие из 12 копий белка основания пентона (Pb) — одного из структурных белков капсида аденовируса человека серотипа 3. Эти ВПЧ по своей структуре не соответствовали настоящему вириону — икосаэдру размером 70–90 нм, в котором пентамеры Pb образуют только углы капсида. Однако Pb отвечает за взамодействие вириона с интернализуемыми рецепторами (интегринами αV/β3 и αV/β5) [101]. Поэтому ВПЧ из Pb хорошо поглощаются с помощью КОЭ мишенями вируса — моноцитами, В-лимфоцитам и, особенно, клетками в митозе [39], в частности, клетками острого миелоидного лейкоза [23].

Интересна попытка использовать ВПЧ вируса Джона Каннингема для доставки лекарственных агентов через гематоэнцефалический барьер. Латентная инфекция этого вируса широко распространена и, по-видимому, безвредна, однако ее активация на фоне иммунодефицита ведет к переносу вируса в центральную нервную систему и развитию прогрессирующей многоочаговой лейкоэнцефалопатии. В эксперименте ВПЧ этого вируса быстро связывались с покрытыми клатрином ямками на люминальной поверхности эндотелиальных клеток гематоэнцефалического барьера, и вскоре обнаруживались в ранних эндосомах, затем накапливались в перинуклеарной области и через 4 ч начинали покидать клетку с базального полюса. Авторы не наблюдали ассоциации ВПЧ с лизосомально-ассоциированным мембранным белком 1 (LAMP1). Соответственно, ВПЧ не подвергались эндолизосомальной деградации и проходили сквозь клетку в виде неразрушенных частиц [104].

Заключение

ВПЧ могут проникать в клетки с помощью различных механизмов эндоцитоза. Не вызывает сомнения, что при конструировании ВПЧ для вакцин или для адресной доставки лекарственных веществ полезно знать механизм эндоцитоза частиц и судьбу поглощенных веществ. При конструировании ВПЧ-вакцин наиболее актуальными показателями представляются эффективность сбора материала и особенности презентации антигенов (или конечный результат презентации — вовлечение антиген-специфических $CD4^+$ и/или $CD8^+$ Т-клеток в ответ на ВПЧ). Влиять на эти показатели можно, выбирая ВПЧ, взаимодействующие с определенными эндоцитарными рецепторами, или вводя в ВПЧ дополнительные компоненты, «нацеливающие» частицы на выбранный рецептор.

Список литературы/References

1. Казачинская Е.И., Арипов В.С., Иванова А.В., Шестопалов А.М. Лихорадка Ласса. Часть 2. Лабораторная диагностика, лечение, разработки лекарственных препаратов // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 4. С. 609–623. [Kazachinskaia E.I., Aripov V.S., Ivanova A.V., Shestopalov A.M. Lassa fever. Part 2. Laboratory diagnostics, treatment, development of medications. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2022, vol. 12, no. 4, pp. 609–623. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-LFL-1815*
2. Новиков Д.В., Мелентьев Д.А. Энтеровирусные (Picornaviridae: Enterovirus) (неполио) вакцины // Вопросы вирусологии. 2022. Т. 67, № 3. С. 185–192. [Novikov D.V., Melentev D.A. Enteroviral (Picornaviridae: Enterovirus) (nonpolio) vaccines. *Voprosy virusologii = Problems of Virology, 2022, vol. 67, no. 3, pp. 185–192. (In Russ.)] doi: 10.36233/0507-4088-111*
3. Acosta E.G., Castilla V., Damonte E.B. Functional entry of dengue virus into Aedes albopictus mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J. Gen. Virol., 2008, vol. 89, no. 2, pp. 474–484. doi: 10.1099/vir.0.83357-0*
4. Agrelli A., de Moura R.R., Crovella S., Brandão L.A.C. Zika virus entry mechanisms in human cells. *Infect. Genet. Evol., 2019, vol. 69, pp. 22–29. doi: 10.1016/j.meegid.2019.01.018*
5. Akula S.M., Naranatt P.P., Walia N.S., Wang F.Z., Fegley B., Chandran B. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) infection of human fibroblast cells occurs through endocytosis. *J. Virol., 2003, vol. 77, no. 14, pp. 7978–7990. doi: 10.1128/jvi.77.14.7978-7990.2003*
6. Aleksandrowicz P., Marzi A., Biedenkopf N., Beimforde N., Becker S., Hoenen T., Feldmann H., Schnittler H.J. Ebola virus enters host cells by macropinocytosis and clathrin-mediated endocytosis. *J. Infect. Dis., 2011, vol. 204, no. 3, pp. 957–967. doi: 10.1093/infdis/jir326*
7. Alkafaas S.S., Abdallah A.M., Ghosh S., Loutfy S.A., Elkafas S.S., Abdel Fattah N.F., Hessien M. Insight into the role of clathrin-mediated endocytosis inhibitors in SARS-CoV-2 infection. *Rev. Med. Virol., 2022, vol. 33, no. 1: e2403. doi: 10.1002/rmv.2403*
8. Amstutz B., Gastaldelli M., Kälin S., Imelli N., Boucke K., Wandeler E., Mercer J., Hemmi S., Greber U.F., Subversion of CtBP1-controlled macropinocytosis by human adenovirus serotype 3. *EMBO J., 2008, vol. 27, no. 7, pp. 956–969. doi: 10.1038/emboj.2008.38*
9. Bachmann M.F., Zinkernagel R.M. Neutralizing antiviral B cell responses. *Annu. Rev. Immunol., 1997, vol. 15, pp. 235–270. doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.235*

10. Bachmann M.F., Jennings G.T. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat. Rev. Immunol., 2010, vol. 10, pp. 787–796. doi: 10.1038/nri2868*
11. Baljon J.J., Wilson J.T. Bioinspired vaccines to enhance MHC class-I antigen cross-presentation. *Curr. Opin. Immunol., 2022, vol. 77: 102215. doi: 10.1016/j.coi.2022.102215*
12. Bantel-Schaal U., Hub B., Kartenbeck J. Endocytosis of adeno-associated virus type 5 leads to accumulation of virus particles in the Golgi compartment. *J. Virol., 2002, vol. 76, no. 5, pp. 2340–2349. doi: 10.1128/jvi.76.5.2340-2349.2002*
13. Bartlett J.S., Wilcher R., Samulski R.J. Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J. Virol., 2000, vol. 74, no. 6, pp. 2777–2785. doi: 10.1128/jvi.74.6.2777-2785.2000*
14. Becker M., Dominguez M., Greune L., Soria-Martinez L., Pfleiderer M.M., Schowalter R., Buck C.B., Blaum B.S., Schmidt M.A., Schelhaas M. Infectious entry of merkel cell polyomavirus. *J. Virol., 2019, vol. 93, no. 6: e02004-18. doi: 10.1128/JVI.02004-18*
15. Besson S., Laurin D., Chauvière C., Thépaut M., Kleman J.P., Pezet M., Manches O., Fieschi F., Aspord C., Fender P. Adenovirus-inspired virus-like-particles displaying melanoma tumor antigen specifically target human DC subsets and trigger antigen-specific immune responses. *Biomedicines, 2022, vol. 10, no. 11: 2881. doi: 10.3390/biomedicines10112881*
16. Blanchard E., Belouzard S., Goueslain L., Wakita T., Dubuisson J., Wychowski C., Rouillé Y. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol., 2006, vol. 80, no. 14, pp. 6964–6972. doi: 10.1128/JVI.00024-06*
17. Bookstaver M.L., Hess K.L., Jewell C.M. Self-assembly of immune signals improves codelivery to antigen presenting cells and accelerates signal internalization, processing kinetics, and immune activation. *Small, 2018, vol. 14, no. 38: e1802202. doi: 10.1002/smll.201802202*
18. Boucrot E., Ferreira A., Almeida-Souza L., Debard S., Vallis Y., Howard G., Bertot L., Sauvonnet N., McMahon H.T. Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway. *Nature, 2015, vol. 517, pp. 460–465. doi: 10.1038/nature14067*
19. Bousarghin L., Hubert P., Franzen E., Jacobs N., Boniver J., Delvenne P. Human papillomavirus 16 virus-like particles use heparan sulfates to bind dendritic cells and colocalize with langerin in Langerhans cells. *J. Gen. Virol., 2005, vol. 86, no. 5, pp. 1297–1305. doi: 10.1099/vir.0.80559-0*
20. Bousarghin L., Touzé A., Sizaret P.Y., Coursaget P. Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *J. Virol., 2003, vol. 77, no. 6, pp. 3846–3850. doi: 10.1128/jvi.77.6.3846-3850.2003*
21. Burgdorf S., Kurts C. Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol., 2008, vol. 20, no. 1, pp. 89–95. doi: 10.1016/j.coi.2007.12.002*
22. Buseyne F., Le Gall S., Boccaccio C., Abastado J.P., Lifson J.D., Arthur L.O., Riviere Y., Heard J.M., Schwartz O. MHC-I-restricted presentation of HIV-1 virion antigens without viral replication. *Nat. Med., 2001, vol. 7, pp. 344–349. doi: 10.1038/85493*
23. Caulier B., Stofleth G., Hannani D., Guidetti M., Josserand V., Laurin D., Chroboczek J., Mossuz P., Plantaz D. Evaluation of the human type 3 adenoviral dodecahedron as a vector to target acute myeloid leukemia. *Mol. Ther. Methods. Clin. Dev., 2020, vol. 20, pp. 181–190. doi: 10.1016/j.omtm.2020.11.009*
24. Champion J.A., Mitragotri S. Role of target geometry in phagocytosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA, 2006, vol. 103, no. 13, pp. 4930–4934. doi: 10.1073/pnas.0600997103*
25. Charpentier J.C., King P.D. Mechanisms and functions of endocytosis in T cells. *Cell Commun Signal, 2021, vol. 19: 92. doi: 10.1186/s12964-021-00766-3*
26. Chen S.L., Liu Y.G., Zhou Y.T., Zhao P., Ren H., Xiao M., Zhu Y.Z., Qi Z.T. Endophilin-A2-mediated endocytic pathway is critical for enterovirus 71 entry into caco-2 cells. *Emerg. Microbes Infect., 2019, vol. 8, no. 1, pp. 773–786. doi: 10.1080/22221751.2019.1618686*
27. Chung S.K., Kim J.Y., Kim I.B., Park S.I., Paek K.H., Nam J.H. Internalization and trafficking mechanisms of coxsackievirus B3 in HeLa cells. *Virology, 2005, vol. 333, no. 1, pp. 31–40. doi: 10.1016/j.virol.2004.12.010*
28. Colbert J.D., Cruz F.M., Rock K.L. Cross-presentation of exogenous antigens on MHC I molecules. *Curr. Opin. Immunol., 2020, vol. 64, pp. 1–8. doi: 10.1016/j.coi.2019.12.005*
29. Cooper A., Shaul Y. Clathrin-mediated endocytosis and lysosomal cleavage of hepatitis B virus capsid-like core particles. *J. Biol. Chem., 2006, vol. 281, no. 24, pp. 16563–16569. doi: 10.1074/jbc.M601418200*
30. Coste B., Xiao B., Santos J.S., Syeda R., Grandl J., Spencer K.S., Kim S.E., Schmidt M., Mathur J., Dubin A.E., Montal M., Patapoutian A. Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels. *Nature, 2012, vol. 483, pp. 176–181. doi: 10.1038/nature10812*
31. Culter C.W., Jotwani R. Dendritic cells at the oral mucosal interface. *J. Dent. Res., 2006, vol. 85, pp. 678-689. doi: 10.1177/154405910608500801*
32. Damm E.M., Pelkmans L., Kartenbeck J., Mezzacasa A., Kurzchalia T., Helenius A. Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *J. Cell. Biol., 2005, vol. 168, no. 3, pp. 477–488. doi: 10.1083/jcb.200407113*
33. Danthi P., Guglielmi K.M., Kirchner E., Mainou B., Stehle T., Dermody T.S. From touchdown to transcription: the reovirus cell entry pathway. *Curr. Top. Microbiol. Immunol., 2010, vol. 343, pp. 91–119. doi: 10.1007/82_2010_32*
34. Day P.M., Lowy D.R., Schiller J.T. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology, 2003, vol. 307, no. 1, pp. 1–11. doi: 10.1016/s0042-6822(02)00143-5*
35. Delamarre L., Pack M., Chang H., Mellman I., Trombetta E.S. Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science, 2005, vol. 307, pp. 1630–1634. doi: 10.1126/science.1108003*
36. Ding W., Zhang L., Yan Z., Engelhardt J.F. Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. *Gene Ther., 2005, vol. 12, pp. 873–880. doi: 10.1038/sj.gt.3302527*
37. Duan D., Li Q., Kao A.W., Yue Y., Pessin J.E., Engelhardt J.F. Dynamin is required for recombinant adeno-associated virus type 2 infection. *J. Virol., 1999, vol. 73, no. 12, pp. 10371–10376. doi: 10.1128/JVI.73.12.10371-10376.1999*
38. Elsen S., Doussière J., Villiers C.L., Faure M., Berthier R., Papaioannou A., Grandvaux N., Marche P.N., Vignais P.V. Cryptic $O2^-$-generating NADPH oxidase in dendritic cells. *J. Cell. Sci., 2004, vol. 117, no. 11, pp. 2215–2226. doi: 10.1242/jcs.01085*

39. Fender P., Schoehn G., Perron-Sierra F., Tucker G.C., Lortat-Jacob H. Adenovirus dodecahedron cell attachment and entry are mediated by heparan sulfate and integrins and vary along the cell cycle. *Virology, 2008, vol. 371, no. 1, pp. 155–164. doi: 10.1016/j.virol.2007.09.026*
40. Geng J., Shi Y., Zhang J., Yang B., Wang P., Yuan W., Zhao H., Li J., Qin F., Hong L., Xie C., Deng X., Sun Y., Wu C., Chen L., Zhou D. TLR4 signalling via Piezo1 engages and enhances the macrophage mediated host response during bacterial infection. *Nat. Commun. 2021, vol. 12: 3519. doi: 10.1038/s41467-021-23683-y*
41. Gonçalves-Carneiro D., McKeating J.A., Bailey D. The measles virus receptor SLAMF1 can mediate particle endocytosis. *J. Virol., 2017, vol. 91, no. 7: e02255-16. doi: 10.1128/JVI.02255-16*
42. Grosse S., Aron Y., Thévenot G., François D., Monsigny M., Fajac I. Potocytosis and cellular exit of complexes as cellular pathways for gene delivery by polycations. *J. Gene Med., 2005, vol. 7, no. 10, pp. 1275–1286. doi: 10.1002/jgm.772*
43. Grunert H.P., Wolf K.U., Langner K.D., Sawitzky D., Habermehl K.O., Zeichhardt H. Internalization of human rhinovirus 14 into HeLa and ICAM-1-transfected BHK cells. *Med. Microbiol. Immunol., 1997, vol. 186, no. 1, pp. 1–9. doi: 10.1007/s004300050039*
44. Guermonprez P., Valladeau J., Zitvogel L., Thery C., Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol., 2002, vol. 20, pp. 621–667. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.100301.064828*
45. Guo Y.Y., Gao Y., Hu Y.R., Zhao Y., Jiang D., Wang Y., Zhang Y., Gan H., Xie C., Liu Z., Zhong B., Zhang Z.D., Yao J. The transient receptor potential vanilloid 2 (TRPV2) channel facilitates virus infection through the Ca2+ -LRMDA axis in myeloid cells. *Adv. Sci. (Weinh)., 2022, vol. 9, no. 34: e2202857. doi: 10.1002/advs.202202857*
46. Guo J., Hou L., Zhou J., Wang D., Cui Y., Feng X., Liu J. Porcine circovirus type 2 vaccines: commercial application and research advances. *Viruses, 2022, vol. 14, no. 9: 2005. doi: 10.3390/v14092005*
47. Hall A., Ekiel I., Mason R.W., Kasprzykowski F., Grubb A., Amrahamson M. Structural basis for different inhibitory specificities of human cystatins C and D. *Biochemistry, 1998, vol. 37, pp. 4071–4079. doi: 10.1021/bi971197j*
48. Harding C.V., Song R. Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules. *J. Immunol., 1994, vol. 153, no. 11, pp. 4925–4933.*
49. Heikkilä O., Susi P., Tevaluoto T., Härmä H., Marjomäki V., Hyypiä T., Kiljunen S. Internalization of coxsackievirus A9 is mediated by {beta}2-microglobulin, dynamin, and Arf6 but not by caveolin-1 or clathrin. *J. Virol., 2010, vol. 84, no. 7, pp. 3666–3681. doi: 10.1128/JVI.01340-09*
50. Herrscher C., Pastor F., Burlaud-Gaillard J., Dumans A., Seigneuret F., Moreau A., Patient R., Eymieux S., de Rocquigny H., Hourioux C., Roingeard P., Blanchard E. Hepatitis B virus entry into HepG2-NTCP cells requires clathrin-mediated endocytosis. *Cell. Microbiol., 2020, vol. 22, no. 8: e13205. doi: 10.1111/cmi.13205*
51. Holla P., Ahmad I., Ahmed Z., Jameel S. Hepatitis E virus enters liver cells through a dynamin-2, clathrin and membrane cholesterol-dependent pathway. *Traffic, 2015, vol. 16, no. 4, pp. 398–416. doi: 10.1111/tra.12260*
52. Huang H.C., Chen C.C., Chang W.C., Tao M.H., Huang C. Entry of hepatitis B virus into immortalized human primary hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis. *J. Virol., 2012, vol. 86, no. 17, pp. 9443–9453. doi: 10.1128/JVI.00873-12*
53. Jutras I., Desjardins M. Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol., 2005, vol. 21, pp. 511–527. doi: 10.1146/annurev.cellbio.20.010403.102755*
54. Kapur N., Thakral D., Durgapal H., Panda S.K. Hepatitis E virus enters liver cells through receptor-dependent clathrin-mediated endocytosis. *J. Viral. Hepat., 2012, vol. 19, no. 6, pp. 436–448. doi: 10.1111/j.1365-2893.2011.01559.x*
55. Katsarou K., Lavdas A.A., Tsitoura P., Serti E., Markoulatos P., Mavromara P., Georgopoulou U. Endocytosis of hepatitis C virus non-enveloped capsid-like particles induces MAPK-ERK1/2 signaling events. *Cell. Mol. Life Sci., 2010, vol. 67, no. 14, pp. 2491–2506. doi: 10.1007/s00018-010-0351-5*
56. Kovacsovics-Bankowski M., Clark K., Benacerraf B., Rock K.L. Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1993, vol. 90, no. 11, pp. 4942–4926. doi: 10.1073/pnas.90.11.4942*
57. Lennon-Dumenil A.M., Bakker A.H., Maehr R., Fiebiger E., Overkleeft H.S., Rosemblatt M., Ploegh H.L., Lagaudrière-Gesbert C. Analysis of protease activity in live antigen-presenting cells shown regulation of the phagosomal proteolytic contents during dendritic cell activation. *J. Exp. Med., 2002, vol. 196, pp. 529–540. doi: 10.1084/jem.20020327*
58. El-Sayed A., Harashima H. Endocytosis of gene delivery vectors: from clathrin-dependent to lipid raft-mediated endocytosis. *Mol. Ther., 2013, vol. 21, no. 6, pp. 1118–1130. doi: 10.1038/mt.2013.54*
59. Macovei A., Radulescu C., Lazar C., Petrescu S., Durantel D., Dwek R.A., Zitzmann N., Nichita N.B. Hepatitis B virus requires intact caveolin-1 function for productive infection in HepaRG cells. *J. Virol., 2010, vol. 84, no. 1, pp. 243–253. doi: 10.1128/JVI.01207-09*
60. Makarkov A.I., Golizeh M., Ruiz-Lancheros E., Gopal A.A., Costas-Cancelas I.N., Chierzi S., Pillet S., Charland N., Landry N., Rouiller I., Wiseman P.W., Ndao M., Ward B.J. Plant-derived virus-like particle vaccines drive cross-presentation of influenza A hemagglutinin peptides by human monocyte-derived macrophages. *NPJ Vaccines, 2019, vol. 4: 17. doi: 10.1038/s41541-019-0111-y*
61. Marchant D., Sall A., Si X., Abraham T., Wu W., Luo Z., Petersen T., Hegele R.G., McManus B.M. ERK MAP kinase-activated Arf6 trafficking directs coxsackievirus type B3 into an unproductive compartment during virus host-cell entry. *J. Gen. Virol., 2009, vol. 90, no. 4, pp. 854–862. doi: 10.1099/vir.0.005868-0*
62. Marjomäki V., Pietiäinen V., Matilainen H., Upla P., Ivaska J., Nissinen L., Reunanen H., Huttunen P., Hyypiä T., Heino J. Internalization of echovirus 1 in caveolae. *J. Virol., 2002, vol. 76, no. 4, pp. 1856–1865. doi: 10.1128/jvi.76.4.1856-1865.2002*
63. Marsac D., Loirat D., Petit C., Schwartz O., Michel M.L. Enhanced presentation of major histocompatibility complex class I-restricted human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Gag-specific epitopes after DNA immunization with vectors coding for vesicular stomatitis virus glycoprotein-pseudotyped HIV-1 Gag particles. *J. Virol., 2002, vol. 76, no. 15, pp. 7544–7553. doi: 10.1128/jvi.76.15.7544-7553.2002*
64. Matlin K.S., Reggio H., Helenius A., Simons K. Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line. *J. Cell. Biol., 1981, vol. 91, no. 3, pp. 601–613. doi: 10.1083/jcb.91.3.601*

65. Matlin K.S., Reggio H., Helenius A., Simons K. Pathway of vesicular stomatitis virus entry leading to infection. *J. Mol. Biol., 1982, vol. 156, no. 3, pp. 609–631. doi: 10.1016/0022-2836(82)90269-8*
66. Mayberry C.L., Soucy A.N., Lajoie C.R., DuShane J.K., Maginnis M.S. JC polyomavirus entry by clathrin-mediated endocytosis is driven by β-arrestin. *J. Virol., 2019, vol. 93, no. 8: e01948-18. doi: 10.1128/JVI.01948-18*
67. Meertens L., Bertaux C., Dragic T. Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *J. Virol., 2006, vol. 80, no. 23, pp. 11571–11578. doi: 10.1128/JVI.01717-06*
68. Meier O., Boucke K., Hammer S.V., Keller S., Stidwill R.P., Hemmi S., Greber U.F. Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. *J. Cell. Biol., 2002, vol. 158, no. 6, pp. 1119–1131. doi: 10.1083/jcb.200112067*
69. Meier O., Greber U.F. Adenovirus endocytosis. *J. Gene. Med., 2004, vol. 6, no, 1, pp. 152–163. doi: 10.1002/jgm.553*
70. Mercer J., Helenius A. Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science, 2008, vol. 320, no. 5875, pp. 531–535. doi: 10.1126/science.1155164*
71. Mercer J., Schelhaas M., Helenius A. Virus entry by endocytosis. *Annu. Rev. Biochem., 2010, vol. 79, pp. 803–833. doi: 10.1146/annurev-biochem-060208-104626*
72. Mittler E., Dieterle M.E., Kleinfelter L.M., Slough M.M., Chandran K., Jangra R.K. Hantavirus entry: Perspectives and recent advances. *Adv. Virus. Res., 2019, vol. 104, pp. 185–224. doi: 10.1016/bs.aivir.2019.07.002*
73. Moffat J.M., Cheong W.S., Villadangos J.A., Mintern J.D., Netter H.J. Hepatitis B virus-like particles access major histocompatibility class I and II antigen presentation pathways in primary dendritic cells. *Vaccine, 2013, vol. 31, no. 18, pp. 2310–2316. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.02.042*
74. Mohsen M.O., Bachmann M.F. Virus-like particle vaccinology, from bench to bedside. *Cell. Mol. Immunol., 2022, vol. 19, pp. 993–1011. doi: 10.1038/s41423-022-00897-8*
75. Nanbo A., Imai M., Watanabe S., Noda T., Takahashi K., Neumann G., Halfmann P., Kawaoka Y. Ebolavirus is internalized into host cells via macropinocytosis in a viral glycoprotein-dependent manner. *PLoS Pathog., 2010, vol. 6, no. 9: e1001121. doi: 10.1371/journal.ppat.1001121*
76. Nichols B. Caveosomes and endocytosis of lipid rafts. *J. Cell. Sci., 2003, vol. 116, no. 23, pp. 4707–4714. doi: 10.1242/jcs.00840*
77. Nishi K., Saigo K. Cellular internalization of green fluorescent protein fused with herpes simplex virus protein VP22 via a lipid raft-mediated endocytic pathway independent of caveolae and Rho family GTPases but dependent on dynamin and Arf6. *J. Biol. Chem., 2007, vol. 282, no. 37, pp. 27503–27517. doi: 10.1074/jbc.M703810200*
78. Nonnenmacher M., Weber T. Adeno-associated virus 2 infection requires endocytosis through the CLIC/GEEC pathway. *Cell. Host. Microbe, 2011, vol. 10, no. 6, pp. 563–576. doi: 10.1016/j.chom.2011.10.014*
79. Nooraei S., Bahrulolum H., Hoseini Z.S., Katalani C., Hajizade A., Easton A.J., Ahmadian G. Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *J. Nanobiotechnol., 2021, vol. 19, no. 1: 59. doi: 10.1186/s12951-021-00806-7*
80. Norbury C.C. Drinking a lot is good for dendritic cells. *Immunology, 2006, vol. 117, pp. 443–451. doi: 10.1111/j.1365-2567.2006.02335.x*
81. Owczarek K., Chykunova Y., Jassoy C., Maksym B., Rajfur Z., Pyrc K. Zika virus: mapping and reprogramming the entry. *Cell. Commun. Signal., 2019, vol. 17, no. 1: 41. doi: 10.1186/s12964-019-0349-z*
82. Pelkmans L., Kartenbeck J., Helenius A. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat. Cell. Biol., 2001, vol. 3, no. 5, pp. 473–483. doi: 10.1038/35074539*
83. Raghu H., Sharma-Walia N., Veettil M.V., Sadagopan S., Chandran B. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus utilizes an actin polymerization-dependent macropinocytic pathway to enter human dermal microvascular endothelial and human umbilical vein endothelial cells. *J. Virol., 2009, vol. 83, no. 10, pp. 4895–4911. doi: 10.1128/JVI.02498-08*
84. Reits E., Griekspoor A., Neijssen J., Groothuis T., Jalink K., van Veelen P., Janssen H., Calafat J., Drijfhout J.W., Neefjes J. Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. *Immunity, 2003, vol. 18, no. 1, pp. 97–108. doi: 10.1016/s1074-7613(02)00511-3*
85. Rejman J., Oberle V., Zuhorn I.S., Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. J., 2004, vol. 377, no. 1, pp. 159–169. doi: 10.1042/BJ20031253*
86. Renard H.F., Boucrot E. Unconventional endocytic mechanisms. *Curr. Opin. Cell. Biol., 2021, vol. 71, pp. 120–129. doi: 10.1016/j.ceb.2021.03.001*
87. Richterová Z., Liebl D., Horák M., Palková Z., Stokrová J., Hozák P., Korb J., Forstová J. Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids toward cell nuclei. *J. Virol., 2001, vol. 75, no. 22, pp. 10880–10891. doi: 10.1128/JVI.75.22.10880-10891.2001*
88. Roberts A.D., Davenport T.M., Dickey A.M., Ahn R., Sochacki K.A., Taraska J.W. Structurally distinct endocytic pathways for B cell receptors in B lymphocytes. *Mol. Biol. Cell, 2020, vol. 31, no. 25, pp. 2826–2840. doi: 10.1091/mbc.E20-08-0532*
89. Roger E., Lagarce F., Garcion E., Benoit J.P. Lipid nanocarriers improve paclitaxel transport throughout human intestinal epithelial cells by using vesicle-mediated transcytosis. *J. Control. Release, 2009, vol. 140, no. 2, pp. 174–181. doi: 10.1016/j.jconrel.2009.08.010*
90. Rust M.J., Lakadamyali M., Zhang F., Zhuang X. Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nat. Struct. Mol. Biol., 2004, vol. 11, no. 6, pp. 567–573. doi: 10.1038/nsmb769*
91. Saeed M.F., Kolokoltsov A.A., Albrecht T., Davey R.A. Cellular entry of ebola virus involves uptake by a macropinocytosis-like mechanism and subsequent trafficking through early and late endosomes. *PLoS Pathog., 2010, vol. 6, no. 9: e1001110. doi: 10.1371/journal.ppat.1001110*
92. Sánchez-San Martín C., López T., Arias C.F., López S. Characterization of rotavirus cell entry. *J. Virol., 2004, vol. 78, no. 5, pp. 2310–2318. doi: 10.1128/jvi.78.5.2310-2318.2004*
93. Savina A., Amigorena S. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol. Rev., 2007, vol. 219, pp. 143–156. doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00552.x*

94. Shafaq-Zadah M., Dransart E., Johannes L. Clathrin-independent endocytosis, retrograde trafficking, and cell polarity. *Curr. Opin. Cell Biol., 2020, vol. 65, pp. 112–121. doi: 10.1016/j.ceb.2020.05.009*
95. Shrimpton R.E., Butler M., Morel A.-S., Eren E., Hue S.S., Ritter M.A. CD205 (DEC-205): a recognition receptor for apoptotic and necrotic self. *Mol. Immunol., 2009, vol. 46, no. 6, pp. 1229–1239. doi: 10.1016/j.molimm.2008.11.016*
96. Sousa de Almeida M., Susnik E., Drasler B., Taladriz-Blanco P., Petri-Fink A., Rothen-Rutishauser B. Understanding nanoparticle endocytosis to improve targeting strategies in nanomedicine. *Chem. Soc. Rev., 2021, vol. 50, no. 9, pp. 5397–5434. doi: 10.1039/d0cs01127d*
97. Tse D., Armstrong D.A., Oppenheim A., Kuksin D., Norkin L., Stan R.V. Plasmalemmal vesicle associated protein (PV1) modulates SV40 virus infectivity in CV-1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun., 2011, vol. 412, no. 2, pp. 220–225. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.07.063*
98. Tsunetsugu-Yokota Y., Morikawa Y., Isogai M., Kawana-Tachikawa A., Odawara T., Nakamura T., Grassi F., Autran B., Iwamoto A. Yeast-derived human immunodeficiency virus type 1 p55(gag) virus-like particles activate dendritic cells (DCs) and induce perforin expression in Gag-specific CD8(+) T cells by cross-presentation of DCs. *J. Virol., 2003, vol. 77, no. 19, pp. 10250–10259. doi: 10.1128/jvi.77.19.10250-10259.2003*
99. Wang Z., Tiruppathi C., Minshall R.D., Malik A.B. Size and dynamics of caveolae studied using nanoparticles in living endothelial cells. *ACS Nano, 2009, vol. 3, no. 12, pp. 4110–4116. doi: 10.1021/nn9012274*
100. West M.A., Prescott A.R., Chan K.M., Zhou Z., Rose-John S., Scheller J., Watts C. TLR ligand-induced podosome disassembly in dendritic cells is ADAM17 dependent. *J. Cell Biol., 2008, vol. 182, no. 5, pp. 993–1005. doi: 10.1083/jcb.200801022*
101. Wickham T.J., Mathias P., Cheresh D.A., Nemerow G.R. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell, 1993, vol. 73, no. 2, pp. 309–319. doi: 10.1016/0092-8674(93)90231-e*
102. Wu Y., Wu W., Wong W.M., Ward E., Thrasher A.J., Goldblatt D., Osman M., Digard P., Canaday D.H., Gustafsson K. Human gamma delta T cells: a lymphoid lineage cell capable of professional phagocytosis. *J. Immunol., 2009, vol. 183, no. 9, pp. 5622–5629. doi: 10.4049/jimmunol.0901772*
103. Yan M., Peng J., Jabbar I.A., Liu X., Filgueira L., Frazer I.H., Thomas R. Despite differences between dendritic cells and Langerhans cells in the mechanism of papillomavirus-like particle antigen uptake, both cells cross-prime T cells. *Virology, 2004, vol. 324, no. 2, pp. 297–310. doi: 10.1016/j.virol.2004.03.045*
104. Ye D., Zimmermann T., Demina V., Sotnikov S., Ried C.L., Rahn H., Stapf M., Untucht C., Rohe M., Terstappen G.C., Wicke K., Mezler M., Manninga H., Meyer A.H. Trafficking of JC virus-like particles across the blood-brain barrier. *Nanoscale Adv., 2021, vol. 3, no. 9, pp. 2488–2500. doi: 10.1039/d0na00879f*
105. Yrlid U., Svensson M., Johansson C., Wick M.J. Salmonella infection of bone marrow-derived macrophages and dendritic cells: influence on antigen presentation and initiating an immune response. *FEMS Immunol. Med. Microbiol., 2000, vol. 27, no. 4, pp. 313–320. doi: 10.1111/j.1574-695X.2000.tb01445.x*
106. Zackova Suchanova J., Hejtmankova A., Neburkova J., Cigler P., Forstova J., Spanielova H. The protein corona does not influence receptor-mediated targeting of virus-like particles. *Bioconjug. Chem., 2020, vol. 31, no. 5, pp. 1575–1585. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.0c00240*
107. Zepeda-Cervantes J., Ramírez-Jarquín J.O., Vaca L. Interaction between virus-like particles (VLPs) and pattern recognition receptors (PRRs) from dendritic cells (DCs): toward better engineering of VLPs. *Front. Immunol., 2020, vol. 11: 1100. doi: 10.3389/fimmu.2020.01100*
108. Zhu Y., Wang H., Xu Y., Hu Y., Chen H., Cui L., Zhang J., He W. Human γδ T cells augment antigen presentation in Listeria monocytogenes infection. *Mol. Med., 2016, vol. 22, pp. 737–746. doi: 10.2119/molmed.2015.00214*

Авторы:
Талаев В.Ю., д.м.н., профессор, зав. лабораторией клеточной иммунологии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Заиченко И.Е., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Бабайкина О.Н., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Светлова М.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Воронина Е.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия.

Authors:
Talayev V.Yu., DSc (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Cellular Immunology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Zaichenko I.Ye., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Cellular Immunology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Babaykina O.N., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Cellular Immunology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Svetlova M.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Cellular Immunology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Voronina E.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Cellular Immunology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation.

Поступила в редакцию 16.03.2023
Принята к печати 07.04.2023

Received 16.03.2023
Accepted 07.04.2023

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 2, с. 234–242

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 2, pp. 234–242

СИГНАЛЬНЫЙ КАСКАД СИСТЕМЫ ВИТАМИНА D В МАКРОФАГАХ ПРОТИВ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

М.Б. Лавряшина[1], Д.О. Имекина[1], Б.А. Тхоренко[2], М.В. Ульянова[1], А.В. Мейер[1], О.Л. Тарасова[1], А.С. Сизова[1], Е.О. Брюхачева[1], Т.В. Пьянзова[1]

[1] *ФГБОУ ВО Кемеровский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Кемерово, Россия*
[2] *ФГБОУ ВО Кемеровский государственный университет, г. Кемерово, Россия*

Резюме. *Mycobacterium tuberculosis* — возбудитель туберкулеза человека — обладает комплексом механизмов, обеспечивающих иммунную эвазию (ускользание от иммунного ответа) и реактивацию процесса с последующей диссеминацией патогена. Модификация реакций иммунной системы через нарушение баланса внутриклеточных сигнальных путей и репрограммирование дифференциальной экспрессии генов — один из таких механизмов. Мишенями для модификаций со стороны *M. tuberculosis* являются гены, продукты которых участвуют в липидном обмене и в таком ключевом для элиминации внутриклеточных патогенов процессе как апоптоз. В обзорной статье анализируется актуальная научная информация по данной проблеме: осуществлена систематизация и обобщение результатов исследований, опубликованных в отечественной и иностранной литературе в период с 2003 по 2022 гг.; приводятся данные о роли ряда молекулярных механизмов в регуляции липидного обмена, аутофагии и апоптоза при инфицировании человека *M. tuberculosis*; обсуждаются современные представления о важности сигнального каскада VDR, контролируемого системой витамина D, в противодействии инфицированию *M. tuberculosis*, его течению и исходу. В статье также приводятся данные об основных генетических линиях *M. tuberculosis*, распространенных на территории России и Сибири, и элементах генетической структуры патогена, важных в контексте обсуждаемой проблемы. Рассматриваются и анализируются эффекты взаимодействия и взаимовлияния внутриклеточных молекулярных каскадов (VDR, NF-κB, MAPK, NFAT5, AMPK, GR), а также их роль в дифференциальной экспрессии генов, обеспечивающих инактивацию и элиминацию *M. tuberculosis*. Приводятся данные, подтверждающие, что одна из основных стратегий иммунной эвазии микобактерии — противодействие аутофагии и апоптозу — реализуется через изменение сигнального пути VDR, включая практикуемые патогеном эпигенетические механизмы. По результатам анализа и обобщения данных литературы (60 статей, представленных в eLIBRARY, PubMed) показано, что за тысячелетнюю историю коэволюции с человеком *M. tuberculosis* приобрели уникальные черты генетической организации и освоили пути иммунной эвазии с использованием негеномных и геномных механизмов. Опубликованные в литературе научные данные подтверждают, что одной из основных стратегий выживания *M. tuberculosis* в макрофагах является модификации баланса внутриклеточных сигнальных каскадов, контролирующих дифференциальную экспрессию генов, обеспечивающих адекватный иммунный ответ на инфицирование с последующей элиминацией патогена.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis, молекулярные сигнальные пути, витамин D, VDR, макрофаги, иммунная эвазия, эпигенетика.*

Адрес для переписки:
Лавряшина Мария Борисовна
650056, Россия, г. Кемерово, ул. Ворошилова, 22а,
ФГБОУ ВО Кемеровский государственный медицинский университет Минздрава России.
Тел.: 8 (3842) 52-10-18. E-mail: lmb2001@mail.ru

Contacts:
Marya B. Lavriashina
650056, Russian Federation, Kemerovo, Voroshilova str., 22a,
Kemerovo State Medical University.
Phone: +7 (3842) 52-10-18. E-mail: lmb2001@mail.ru

Для цитирования:
Лавряшина М.Б., Имекина Д.О., Тхоренко Б.А., Ульянова М.В., Мейер А.В., Тарасова О.Л., Сизова А.С., Брюхачева Е.О., Пьянзова Т.В. Сигнальный каскад системы витамина D в макрофагах против Mycobacterium tuberculosis // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 2. С. 234–242. doi: 10.15789/2220-7619-VDS-2033

Citation:
Lavryashina M.B., Imekina D.O., Tkhorenko B.A., Ulyanova M.B., Meyer A.B., Tarasova O.L., Sizova A.S., Bryukhacheva E.O., Pyanzova T.V. Vitamin D signal cascade in macrophages AGAINST Mycobacterium tuberculosis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 2, pp. 234–242. doi: 10.15789/2220-7619-VDS-2033

Статья подготовлена в рамках гранта Российского научного фонда № 22-25-20209 и Министерства науки и высшего образования Кузбасса.
This article was prepared within the framework of grant No. 22-25-20209 of the Russian Science Foundation and the Ministry of Science and Higher Education of Kuzbass.

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-VDS-2033

VITAMIN D SIGNAL CASCADE IN MACROPHAGES AGAINST *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Lavryashina M.B.[a], Imekina D.O.[a], Tkhorenko B.A.[b], Ulyanova M.B.[a], Meyer A.B.[a], Tarasova O.L.[a], Sizova A.S.[a], Bryukhacheva E.O.[a], Pyanzova T.V.[a]

[a] *Kemerovo State Medical University, Ministry of Health of Russian Federation, Kemerovo, Russian Federation*
[b] *Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation*

Abstract. *Mycobacterium tuberculosis* is the causative agent of human tuberculosis; enabling multilayered mechanisms to evade from immune response along with reactivation of the process with subsequent pathogen dissemination. Modification of immune responses through imbalanced intracellular signaling pathways and reprogramming of differential gene expression is one of such mechanisms. Modification targets for *M. tuberculosis* are the genes which products are involved in lipid metabolism and apoptosis, a key to eliminate intracellular pathogens. here, we review the current scientific data related to this problem: the results of studies published in domestic and foreign literature from the years 2003 to 2022 were systematized and summarized; data on the role of a number of molecular mechanisms regulating lipid metabolism, autophagy and apoptosis in human TB-infection; discuss contemporary ideas about the importance of the VDR signaling cascade controlled by the vitamin D-axis counteracting *M. tuberculosis* infection, its course and outcome. In addition, there are provided the data on the main *M. tuberculosis* genetic lines common in Russia and Siberia and the elements of the pathogen-related genetic structure that are important in the context of the topic. The effects of interplay and interactions of intracellular molecular cascades (VDR, NF-κB, MAPK, NFAT5, AMPK, GR) are considered and analyzed, as well as their role in the differential expression of genes that ensure *M. tuberculosis* inactivation and elimination. Presenting the data confirming that one of the main strategies of mycobacterium immune evasion — counteraction to autophagy and apoptosis — is implemented through altered VDR signaling pathway, including the epigenetic mechanisms occurring in the pathogen. Based on results of the analysis and summarized literature data (60 articles retrieved from eLIBRARY, PubMed), it is demonstrated that during the thousand-year history of co-evolution with human, *M. tuberculosis* acquired unique features of genetic organization and mastered the pathways of immune evasion using non-genomic and genomic mechanisms. Available publications confirm that one of the main strategies for *M. tuberculosis* survival in macrophages is to modify a balance between intracellular signaling cascades controlling the differential expression of genes that provide a proper immune response to infection, followed by pathogen elimination.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis, molecular signaling pathways, vitamin D, VDR, macrophages, immune evasion, epigenetics.*

Введение

Патогенез туберкулеза (ТБ) в значительной мере определяется регуляцией баланса иммунных механизмов, участвующих в защите хозяина, и различными стратегиями выживания (иммунной эвазии), практикуемыми *Mycobacterium tuberculosis (M. tuberculosis)* [24, 38, 47]. Реакции иммунной системы на инфицирование *M. tuberculosis* реализуются в рамках противобактериального иммунного ответа через распознавание «чужого», активацию и элиминацию активатора с привлечением компонентов видового (врожденного) и адаптивного (приобретенного) иммунитета. Иммунная эвазия *M. tuberculosis* фиксируется на всех этапах формирования иммунного ответа и включает как ускользание от распознавания, так и ингибирование/модификацию механизмов элиминации [4, 24]. Второй путь является, по всей видимости, преимущественной стратегией выживания *M. tuberculosis*, в том числе, в составе гранулемы, для выжидания «окна возможностей» последующей реактивации процесса и диссеминации патогена.

В ходе тысячелетий коэволюции с человеком *M. tuberculosis* приобрели комплекс уникальных характеристик [15, 17, 61]. С одной стороны, это высококонсервативный геном, а с другой — изощренные генетически детерминированные механизмы модификации баланса внутриклеточных сигнальных путей хозяина, контролирующих дифференциальную экспрессию генов, так или иначе задействованных в иммунном ответе на микобактериальную инфекцию [12].

В этом ключе особый интерес представляет система витамина D и основной внутриклеточный рецептор данного витамина — транскрипционный фактор VDR (vitamin D receptor). Молекулярные каскады, опосредованные VDR, его лигандами и рецепторами-партнерами, находятся во взаимосвязи (как синергичной, так конкурентной и/или реципрокной) с сигнальными путями NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), MAPK (mitogen-activated protein kinase), AMPK (AMP-activated protein kinase), NFAT5 (nuclear factor of activated T-cells), GR (рецептор глюкокортикоидов), NR3C1 (nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1) и другими. При этом эффекты каскада VDR чрезвычайно разнообразны [8], имеют выраженную противовоспалительную направленность и регулируют такие процессы, как аутофагия, апоптоз, гомеостаз липидов, баланс цитокинов, что повышает эффективность сдерживания распространения микобактериальной инфекции в организме человека и обеспечивает эффективную элиминацию *M. tuberculosis* [30, 34].

Высокая интенсивность исследований по проблематике туберкулеза и микобактериальной инфекции требует постоянного критического пересмотра, обобщения и систематизации научных данных. Это находит свое отражение в публикации обзорных статей [38, 40]. Цель настоящего обзора — анализ и обобщение современных данных о сигнальных каскадах системы витамина D в клетках макрофагального ряда, а также механизмах иммунной эвазии *M. tuberculosis*.

Материалы и методы

По ключевым словам, проведен поиск статей, представленных в российских и международных базах данных (eLIBRARY, PubMed). В качестве ключевых слов использованы: *Mycobacterium tuberculosis*, молекулярные сигнальные пути, витамин D, VDR, макрофаги, иммунная эвазия, эпигенетика. В результате скрининга и анализа опубликованных данных в материалы обзорной статьи включено 60 публикаций.

Генетическая структура и распространенность линий *M. tuberculosis*

Сегодня доступны данные геномного секвенирования более чем десятков тысяч штаммов *M. tuberculosis* с различными фенотипами и генотипами (Mycobrowser, https://mycobrowser.epfl.ch; BioCyc, https://mycobacterium.biocyc.org). Примечательно, что эти штаммы отличаются друг от друга в среднем не более чем на 2 тыс. SNP (single nucleotide polymorphism) при размере микобактериального генома более 4,4 млн пар нуклеотидов.

На настоящий момент методами сравнительной геномики выявлено 10 филогенетических линий *M. tuberculosis*. Наиболее распространенные в России — штаммы генетического семейства Beijing, многие из которых характеризуются высокой степенью вирулентности и лекарственной устойчивостью [1, 2, 32, 42]. Они представлены в основном типами 100-32 и 94-32 и родственными им геновариантами, и составляют до 80% всех изолятов данного семейства, циркулирующих на территории Западной Сибири [3].

К часто встречающимся на территории России также относятся семейства LAM — частота в Сибири от 8 до 17% [19] и Ural — около 8–9% [41]. Они также демонстрируют высокую трансмиссивность, однако уступают Beijing по этому качеству [9].

Геном *M. tuberculosis* содержит более 4 тыс. генов (4056 генов *M. tuberculosis* H37Rv), которые занимают более 90% емкости генома. Известны такие особенности генетической организации *M. tuberculosis*, как наличие генов, кодирующих полный спектр реакций пластического обмена (синтез незаменимых аминокислот, витаминов, ферментов и кофакторов). Это нетипично для внутриклеточных паразитов, хоть и факультативных, и может быть связано с доступностью веществ определенных классов в фагосомах макрофагов, что способствует выживанию *M. tuberculosis*. Далее обращает на себя внимание тот факт, что значительную долю генома (не менее 8%) занимают гены, кодирующие обмен липидов, при том что сами микобактерии их практически не синтезируют, а, по-видимому, получают путем транспорта из клеток хозяина [53]. Роль липидов в персистении и размножении *M. tuberculosis* в макрофагах и пенистых клетках общеизвестна [45], а данные о том, что липиды способны участвовать в лиганд-независимой активации TLRs (Toll-like receptor) и, соответственно, модулировать процесс воспаления — требуют отдельного осмысления в контексте микобактериальной инфекции [21, 25]. Третья интересная черта — наличие генов (около 10% генома), кодирующих консервативные белки двух больших семейств: PE (proline-glutamate, 100 белков) и PPE (proline-proline-glutamate, 67 белков), выполняющих широкий спектр ролей в вирулентности и иммуномодуляции [45, 46]. Например, PE_PGRS20 и PE_PGRS47 подавляют критически важный механизм элиминации *M. tuberculosis* — аутофагию (вероятно, через связывание с Rab1A, ингибирующее транслокацию комплекса Ulk1 в преаутофагосому), снижают секрецию провоспалительных цитокинов и нарушают презентацию антигена Т-хелперам через MHC II класса [45, 52]. Это указывает на сочетанное воздействие *M. tuberculosis* на врожденный и адаптивный иммунитет, которое способствует ускользанию бактерий от защиты хозяина.

Система витамина D и особенности внутриклеточного сигналинга при инфицировании *M. tuberculosis*

Макрофаги (Мф) играют исключительно важную роль в иммунном ответе на инфицирование *M. tuberculosis*, реализуя такие реакции как фагоцитоз, бактерицидность, секреция про- и противовоспалительных факторов и т. д. Тканевые (альвеолярные) и воспалительные (рекрутируемые) Мф являются основной целью инвазии *M. tuberculosis*, так как на разных этапах микобактериальной инфекции обеспечивают персистенцию выживших микобактерий — стадия латентной туберкулезной инфекции (ЛТИ) — с перспективой прогрессирования болезни при соответствующих условиях.

M. tuberculosis и компоненты ее клеточной стенки распознаются PRR (pattern recognition receptors) врожденного иммунитета, в том числе, TLR1, TLR2, TLR4, TLR7 и TLR9, а именно взаимодействуют с TLR2 в ассоциации с TLR1/TLR6, с помощью TLR4 или TLR9. При этом TLR2 участвует в распознавании различных антигенов клеточной стенки микобактерий, TLR4 активируется белками теплового шока Hsp 60/65 и антигеном 38 kDa *M. tuberculosis*, а TLR9 распознает неметилированные мотивы CpG ДНК микобактерий [27, 31]. Цитозольная ДНК *M. tuberculosis* также распознается cGAS (cyclic GMP-AMP synthase), что стимулирует высвобождение cGMP, активацию рецепторов убиквитина p62, NDP52 (Nuclear domain 10 protein 52) и оптиневрина [55]. Эти рецепторы связываются с убиквитинированным патогеном и обеспечивают специфическое нацеливание аутофагосомы [54].

Активация врожденной иммунной системы через TLRs на макрофагах запускает классический механизм биогенеза активных форм витамина D — индуцирует цитохром CYP27B1, гидроксилирующий неактивный витамин D в кальцитриол, увеличивая его биодоступность в макрофагах. Эффекты кальцитриола чрезвычайно разнообразны и базируются на эндокринной, паракринной, аутокринной активностях. Действие кальцитриола может быть классическим (геномным), связанным с регуляцией транскрипции генов-мишеней VDR [39], в том числе генов иммунного ответа, и негеномным — быстрый клеточный ответ через связывание с мембранным, ядерным VDR и межбелковые взаимодействия.

Негеномное действие проявляется в активации сигнальных молекул (фосфолипазы C и фосфолипазы A2 (PLA 2), фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) и p21ras), в быстром образовании вторичных мессенджеров (Ca^{2+}, cAMP, жирных кислот и 3-фосфоинозитидов, таких как фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат), в активации протеинкиназ (протеинкиназы A, митоген-активируемых протеинкиназ (MAPK), протеинкиназы C (PKC), Src-киназы и Ca^{2+}-кальмодулинкиназы II) и в открытии Ca^{2+}- и Cl-каналов. Негеномные эффекты проявляются также в способности модулировать геномную функцию [23].

Активация TLR и других элементов системы распознавания патогена лигандами *M. tuberculosis* запускает внутриклеточные каскады (VDR, NF-κB, MAPK, NFAT5, AMPK, GR и др.), регулирующие дифференциальную экспрессию генов, продукты которых обеспечивают адекватный иммунный ответ на инфицирование *M. tuberculosis* и обуславливают в итоге исход заболевания. Одним из таких путей является сигнальная система витамина D. Данная система включает активные формы витамина D — кальцитриол ($1,25(OH)_2D_3$) и метаболиты неклассического пути [50], гены, продукты которых участвуют в транспорте и метаболизме витамина D *(DBP, CYP2R1, CYP27A1, CYP27B1, CYP11A1)*, а также серию внутриклеточных рецепторов: основной — VDR (vitamin D receptor), дополнительные — RXR (retinoid X receptor), LXR (liver X receptor), PRARγ (proliferator-activated receptor gamma) и другие.

Каскад, индуцирующий VDR-сигналинг в моноцитах/макрофагах через активацию экспрессии VDR и CYP27B1, по некоторым данным активируется через TLR2/TLR1, и характеризуется многофакторной регуляцией — зависит от среды (доступности активных метаболитов витамина D), генетического полиморфизма и эпигенетических механизмов [35]. Лигандированный кальцитриолом VDR связывается со специфическими последовательностями ДНК — элементами VDREs в генах-мишенях и вокруг них, что приводит к активации или репрессии транскрипции кодируемых ими продуктов. Гетеродимеризация лигандированного VDR с RXR обеспечивает высокоаффинное связывание с VDREs и изменение экспрессии генов, опосредованное способностью рекрутировать транскрипционные коактиваторы [22], а также прямо или косвенно взаимодействовать с базальными факторами транскрипции (TFIIB и TAFs — TATA-бокс-связывающие белки), что приводит к созданию стабильного преинициационного комплекса [11].

Основные эффекты сигнального пути VDR включают индукцию синтеза антибактериального кателицидина, β-дефензина 2, гепсидина (HAMP), регуляцию экспрессии TLR по типу обратной связи и экспрессию NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain containing 2). При индукции β-дефензина 2 система витамина D действует совместно с дополнительными иммунными сигналами (связывание MDP с NOD2, воздействие IL-1) за счет сигнального пути NF-κB [12].

Что касается иммуномодулирующей активности кальцитриола, то она проявляется через влияние на сигнальные пути (NF-κB, GR, NFAT и др.) и осуществляется за счет конкурентного связывания, а также перекрестных взаимодействий. Активированный и гетеродимеризованный VDR ингибирует сигнальный путь NF-κB, повышая синтез IκB и препятствуя связыванию NF-κB с ДНК. По всей видимости такой эффект подразумевает не простое ингибирование, а регуляцию баланса про- и противовоспалительных элементов иммунного ответа, так как кальцитриол и другие активные метаболиты витамина D, взаимодействуя

с VDR в кооперации с сигнальным путем NF-κB, индуцируют экспрессию различных генов, в том числе гена кателицидина — бактерицидного белка, который обеспечивает солокализацию аутофагосом и поврежденных фагосом, содержащих микобактерии [60]. Это критически важно, так как одним из результатов туберкулезного инфицирования является ингибирование фагосомального созревания, апоптоза и аутофагии. Кроме того, кальцитриол стимулирует экспрессию MKP1 (MAP-киназа p38). Данная киназа активируется провоспалительными стимулами и вызывает экспрессию провоспалительных белков, таких как IL-6 и TNFα. Глюкокортикоиды также вызывают экспрессию MKP1. Причем это действие усиливается кальцитриолом за счет повышения экспрессии коактиватора транскрипции Med14 [58].

Представления о плейотропности эффектов системы витамина D постоянно дополняются. Недавними исследованиями показано, что VDR — не единственная мишень активных форм метаболитов витамина D. В качестве второго основного рецептора предложен LXR — ядерный рецептор оксистеролов (оксигенированных производных холестерина), который после связывания лиганда гетеродимеризуется с RXR, транслоцируется в ядро и активирует транскрипционную активность генов, содержащих элементы ответа LXR (LXRE: *ApoE, LPL, CYP7A1* и другие). Биоинформационный анализ депонированных микрочипов и данных RNAseq идентифицировал сигнальный комплекс LXR/RXR как мишень для гидроксипроизводных D3 [51]. При этом LXR — важный регулятор метаболизма липидов, липидного гомеостаза и воспаления — ключевых элементов, определяющих перспективы *M. tuberculosis* к персистенции в организме человека и исход инфицирования.

Активация внутриклеточных сигнальных путей при распознавании *M. tuberculosis* безусловно носит сетевой характер. В моноцитах/макрофагах человека передача сигналов витамина D активирует антимикробную защиту от инфекции *M. tuberculosis*, в том числе, посредством стимуляции сигнального пути AMPK (AMP-activated protein kinase) — одного из центральных регуляторов клеточного и организменного метаболизма, в том числе аутофагии [36]. Этот процесс также регулируется функциональным модулем PPARγ и VDR, которые являются партнерами RXR для гетеродимеризации. Между ними наблюдается конкуренция за связывание RXR, результат которой зависит от внутриклеточных факторов [20] и влияет на дифференциальную экспрессию генов-мишеней. Кроме того, установлено, что PPARγ способен прямо связывается с VDR и ингибировать трансактивацию, опосредованную витамином D, что указывает на молекулярные механизмы, объединяющие пути PPARγ и VDR, а баланс PPARγ и RXRα модулирует внутриклеточный сигналинг VDR [7]. Отметим, что недавно продемонстрирована способность липидов *M. tuberculosis* связываться с PPARγ в инфицированных макрофагах, что изменяет активность скэвенджер-рецептора CD36, блокирует созревание фаголизосом через индукцию IL-10, ингибирует врожденный иммунный ответ за счет альтернативной поляризации макрофагов и приводит к выживанию фагоцитированных *M. tuberculosis* [33]. В этом ключе можно предположить, что через PPARγ *M. tuberculosis* способны также влиять на VDR-сигналинг и баланс внутриклеточных молекулярных каскадов.

Система витамина D и стратегии иммунной эвазии *M. tuberculosis*

Инфицируя Мф, *M. tuberculosis* влияют на их дифференцировку, фенотип и функции, запуская механизмы, приводящие к перерождению Мф в пенистые клетки, которые являются депо *M. tuberculosis*. Трансформация Мф в пенистые клетки сопровождается нарушением липидного гомеостаза — *M. tuberculosis* индуцируют образование липидных телец в Мф, угнетением аутофагии (липофагии), нарушением транспорта и метаболизма липидов.

Ингибирование аутофагии — один из основных элементов иммунной эвазии *M. tuberculosis* на ранних стадиях инфицирования. Этот процесс может рассматриваться как причина несостоятельности иммунного ответа, так как аутофагия определяет устойчивость организма к внутриклеточным патогенам. Сигнальный путь VDR, как было показано выше, прямо или опосредовано является индуктором аутофагии — процесса, который в отличие от некроза, приводит к сдерживанию *M. tuberculosis*-инфекции и элиминации патогена. Еще одним элементом действия витамина D является ослабление дисфункции аутофагического потока путем ингибирования сигнального пути Ca^{2+} [59].

Иммунная эвазия *M. tuberculosis*, нацеленная на модификацию дифференциальной экспрессии генов, реализуется через межбелковые взаимодействия и различные эпигенетические механизмы, в том числе метилирование ДНК. Недавние исследования показали, что *M. tuberculosis*, изменяя эпигеном человека, влияет на транскрипцию ключевых генов, участвующих в иммунном ответе и определяющих персистенцию патогена [16]. В этом ключе исследование профилей метилирования ДНК при латентной туберкулезной инфекции и туберкулезе легких рассматривается как один из путей

поиска информативных биомаркеров для прогнозирования перспектив течения микобактериальной инфекции [10, 18].

В нормально функционирующем геноме большинство сайтов CpG, ответственных за изменение активности экспрессии генов, находятся в неметелированном состоянии [57]. Гиперметилирование ДНК в промоторных областях генов приводит к репрессии их транскрипции, а в «телах» генов, как правило, связано с активацией транскрипции.

M. tuberculosis обладает способностью добавлять метильную группу не только на островках CpG [37], но и на иных последовательностях ДНК [49]. Так, секретируемый *M. tuberculosis* белок Rv2966c, представляющий собой 5-метилцитозин-специфическую ДНК-метилтрансферазу, связывает гистоны H3/H4 и метилирует цитозины неканоническим образом — в динуклеотидах CpA и CpT, что приводит к репрессии генов [49]. Такие особенности метилтрансфераз позволяют *M. tuberculosis* избирательно и эффективно модулировать экспрессию генов в инфицированной клетке через эпигенетические модификации конкретных геномных локусов.

В контексте проблематики статьи важно, что инактивация транскрипции VDR может происходить как с привлечением комплекса VDR/RXR корепрессоров и деацетилаз, так и эпигенетическими механизмами [44]. Эпигенетическим деметилированием также регулируется продукция 1α-гидроксилазы [48]. Анализ состояния метилирования гена *VDR* с помощью прямого секвенирования фрагмента гена (269 п.н.), содержащего 16 CpG-сайтов, показал, что у больных туберкулезом *VDR* находится в гиперметилированном состоянии. Таким образом, есть основания полагать, что уровень метилирования гена *VDR* [26] и ряда других генов, задействованных в иммунном ответе [37], может влиять на прогрессирование микобактериальной инфекции и исход заболевания.

Еще одним уникальным механизмом модификации активности системы витамина D, практикуемым *M. tuberculosis*, является выработка богатого спектра липидов, которые позволяют им существовать в некомфортных условиях макрофага и модифицировать иммунный ответ хозяина. Различные штаммы микобактерий содержат гены, подобные генам цитохрома P450. Например, *MTCYP124* (*CYP124* of *M. tuberculosis*), способный гидроксилировать липиды, участвующие в формировании клеточной стенки микобактерий и обладающий окислительной активностью, специфичной для метильной боковой цепи холестерина и холес-4-ен-3-она [28]. В работе [55] проведено исследование данного цитохрома. Полученные результаты доказывают окислительную способность *MTCYP124* в отношении витамина D3 и 7-дегидрохолестерина, при этом катализированное гидроксилирование боковой цепи витамина D3 приводит к образованию неактивной формы витамина. Вероятно, *MTCYP124* имеет такую же направленность действия, как и CYP24A1, представляющий собой 24-гидроксилазу, которая инициирует инактивацию витамина D3. Таким образом, микобактерии могут влиять на гомеостаз системы витамина D и посредством модификации метаболизма предшественников витамина D3.

Другой не менее уникальной особенностью *M. tuberculosis* является способность индуцировать деградацию внеклеточного матрикса легких на основе экспрессии матриксных металлопротеиназ (ММП). В этом ключе описан механизм, посредством которого витамин D обеспечивает реакцию на индуцированную *M. tuberculosis* экспрессию, секрецию и активность матриксных металлопротеиназ, ограничивая деградацию внеклеточного матрикса и снижая инфекционность. ММП, как правило, не экспрессируются в здоровых, некальцинированных тканях, но активируются в клетках, направленных на ремоделирование и восстановление тканей [43]. В работе [14] исследовано влияние кальцитриола на экспрессию, секрецию и активность ММП-1, ММП-7, ММП-9 и ММП-10 в инфицированных *M. tuberculosis* макрофагах и моноцитах. Оказалось, что кальцитриол ослабляет повышение экспрессии ММП-7 и ММП-10, индуцированное микобактериями, а также подавляет секрецию ММП-7 в инфицированных мононуклеарных клетках периферической крови.

Заключение

За тысячелетнюю историю контакта с иммунной системой человека *M. tuberculosis* приобрели комплекс уникальных механизмов, обеспечивающих успешную персистенцию в организме хозяина и ускользание от иммунного ответа. Ингибирование аутофагии, модификация липидного гомеостаза, метаболизма витамина D, сигналинга, опосредованного витамином D через межбелковые и эпигенетические механизмы — все это элементы стратегии иммунной эвазии *M. tuberculosis*, требующие системного изучения, кропотливого, критического анализа и обобщения новых научных данных.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы/References

1. Беспятых Ю.А., Виноградова Т.И., Маничева О.А., Заболотных Н.В., Догонадзе М.З., Витовская М.Л., Гуляев А.С., Журавлев В.Ю., Шитиков Е.А., Ильина Е.Н. Вирулентность Mycobacterium tuberculosis генотипа Beijing в условиях in vivo // Инфекция и иммунитет. 2019. № 1. С. 173–182. [Bespyatykh Yu.A., Vinogradova T.I., Manicheva O.A., Zabolotnykh N.V., Dogonadze M.Z., Vitovskaya M.L., Gulyaev A.S., Zhuravlev V.Yu., Shitikov E.A., Ilyina E.N. Virulence of Mycobacterium tuberculosis genotype. Virulence of Mycobacterium tuberculosis of the Beijing genotype in vivo. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and immunity, 2019, no. 1, pp. 173–182. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-173-182*
2. Вязовая А.А., Мокроусов И.В., Журавлев В.Ю., Соловьева Н.С., Оттен Т.Ф., Маничева О.А., Вишневский Б.И., Нарвская О.В. Молекулярная характеристика мультирезистентных штаммов Mycobacterium tuberculosis, выделенных на Северо-Западе России // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2016. № 1. С. 30–33. [Vyazovaya A.A., Mokrousov I.V., Zhuravlev V.Yu., Solovyova N.S., Otten T.F., Manicheva O.A., Vishnevsky B.I., Narvskaya O.V. Molecular characterization of multidrug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis isolated in the North-West of Russia. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology. 2016, no. 1, pp. 30–33. (In Russ.)] doi: 10.18821/0208-0613-2016-34-1-30-33*
3. Вязовая А.А., Пасечник О.А., Герасимова А.А., Мокроусов И.В. Структура популяции генетического семейства Beijing Mycobacterium tuberculosis на территории Западной Сибири // Туберкулез и болезни легких. 2020. Т. 98, № 5. С. 32–36. [Vyazovaya A.A., Pasechnik O.A., Gerasimova A.A., Mokrousov I.V. The population structure of Beijing family of Mycobacterium tuberculosis in Western Siberia. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Diseases, 2020, vol. 98, no. 5, pp. 32–36. (In Russ.)]. doi: 10.21292/2075-1230-2020-98-5-32-36*
4. Зенков Н.К., Чечушков А.В., Кожин П.М., Колпакова Т.А., Меньшикова Е.Б. Макрофаг и микобактерия: война без начала и конца // Успехи современной биологии. 2015. Т. 135, № 6. С. 554–574. [Zenkov N.K., Chechushkov A.V., Kozhin P.M., Kolpakova T.A., Menshchikova E.B. Macrophage and mycobacteria: war without beginning or end. *Uspekhi sovremennoi biologii = Successes of Modern Biology, 2015, vol. 135, no. 6, pp. 554–574. (In Russ.)*]
5. Каминская Г.О., Абдуллаев Р.Ю. Туберкулез и обмен липидов // Туберкулез и болезни легких. 2016. Т. 94, № 6. С. 53–63. [Kaminskaya G.O., Abdullaev R.Yu. Tuberculosis and lipid metabolism. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and lung diseases, 2016, vol. 94, no. 6, pp. 53–63. (In Russ.)] doi: 10.21292/2075-1230-2016-94-6-53-63*
6. Alimirah F., Peng X., Yuan L., Mehta R.R., von Knethen A., Choubey D., Mehta R.G. Crosstalk between the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ) and the vitamin D receptor (VDR) in human breast cancer cells: PPARγ binds to VDR and inhibits 1α,25-dihydroxyvitamin D3 mediated transactivation. *Exp Cell Res., 2012, vol. 318, no. 19, pp. 2490–2497. doi: 10.1016/j.yexcr.2012.07.020*
7. Anand P.K., Kaul D. Vitamin D3-dependent pathway regulates TACO gene transcription. *Biochem. Biophys. Res. Commun., 2003, vol. 310, no. 3, pp. 876–877. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.09.087*
8. Bishop L.E., Ismailova A., Dimeloe S., Hewison M., White J.H. Vitamin D and immune regulation: antibacterial, antiviral, anti-inflammatory. *JBMR Plus., 2020, vol. 5, no. 1. doi: 10.1002/jbm4.10405*
9. Brudey K., Driscoll J.R., Rigouts L., Prodinger W.M., Gori A., Al-Hajoj S.A., Allix C., Aristimuño L., Arora J., Baumanis V., Binder L., Cafrune P., Cataldi A., Cheong S., Diel R., Ellermeier C., Evans J.T., Fauville-Dufaux M., Ferdinand S., Garcia de Viedma D., Garzelli C., Gazzola L., Gomes H.M., Guttierez M.C., Hawkey P.M., van Helden P.D., Kadival G.V., Kreiswirth B.N., Kremer K., Kubin M., Kulkarni S.P., Liens B., Lillebaek T., Ho M.L., Martin C., Martin C., Mokrousov I., Narvskaïa O., Ngeow Y.F., Naumann L., Niemann S., Parwati I., Rahim Z., Rasolofo-Razanamparany V., Rasolonavalona T., Rossetti M.L., Rüsch-Gerdes S., Sajduda A., Samper S., Shemyakin I.G., Singh U.B., Somoskovi A., Skuce R.A., van Soolingen D., Streicher E.M., Suffys P.N., Tortoli E., Tracevska T., Vincent V., Victor T.C., Warren R.M., Yap S.F., Zaman K., Portaels F., Rastogi N., Sola C. Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol., 2006, vol. 6: 23. doi: 10.1186/1471-2180-6-23*
10. Chen Y.C., Hsiao C.C., Chen T.W., Wu C.C., Chao T.Y., Leung S.Y., Eng H.L., Lee C.P., Wang T.Y., Lin M.C. Whole genome DNA methylation analysis of active pulmonary tuberculosis disease identifies novel epigenotypes: PARP9/miR-505/RASGRP4/GNG12 gene methylation and clinical phenotypes. *Int. J. Mol. Sci., 2020, vol. 21, no. 9. doi: 10.3390/ijms21093180*
11. Christakos S. Vitamin D gene regulation. In: Principles of bone biology. Eds: Bilezikian J., Raisz L.G., Martin T.J. *New York: Elsevier-Academic, 2008, pp. 779–794. doi: 10.1016/B978-012098652-1.50134-7*
12. Chun R.F., Liu P.T., Modlin R.L., Adams J.S., Hewison M. Impact of vitamin D on immune function: lessons learned from genome-wide analysis. *Front. Physiol., 2014, vol. 5: 151. doi: 10.3389/fphys.2014.00151*
13. Clark-Curtiss J.E., Haydel S.E. Molecular genetics of Mycobacterium tuberculosis pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol., 2003., vol. 57., pp. 517–49. doi: 10.1146/annurev.micro.57.030502.090903*
14. Coussens A. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits matrix metalloproteinases induced by Mycobacterium tuberculosis infection. *Immunology, 2009, vol. 127, no. 4, pp. 539–48. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.03024.x*
15. Daniel T.M., Iversen P.A. Hippocrates and tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis., 2015, vol. 19, no. 4, pp. 373–374. doi: 10.5588/ijtld.14.0736*
16. DiNardo A.R., Rajapakshe K., Nishiguchi T., Grimm S.L., Mtetwa G., Dlamini Q., Kahari J., Mahapatra S., Kay A., Maphalala G., Mace E.M., Makedonas G., Cirillo J.D., Netea M.G., van Crevel R., Coarfa C., Mandalakas A.M. DNA hypermethylation during tuberculosis dampens host immune responsiveness. *J. Clin. Invest., 2020, vol. 130, no. 6, pp. 3113–3123. doi: 10.1172/JCI134622*
17. Donoghue H.D. Paleomicrobiology of human tuberculosis. *Microbiol. Spectr., 2016, vol. 4, no. 4. doi: 10.1128/microbiolspec.PoH-0003-2014*
18. Du Y., Gao X., Yan J., Zhang H., Cao X., Feng B., He Y., He Y., Guo T., Xin H., Gao L. Relationship between DNA methylation profiles and active tuberculosis development from latent infection: a pilot study in nested case-control design. *Microbiol. Spectr., 2022, vol. 10, no. 3. doi: 10.1128/spectrum.00586-22*
19. Dymova M.A., Kinsht V.N., Cherednichenko A.G., Khrapov E.A., Svistelnik A.V., Filipenko M.L. Highest prevalence of the Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype isolates in patients newly diagnosed with tuberculosis in the Novosibirsk oblast, Russian Federation. *J. Med. Microbiol., 2011, vol. 60, no. 7, pp. 1003–1009. doi: 10.1099/jmm.0.027995-0*

20. Fadel L., Reho B., Volko J., Bojcsuk D., Kolostyak Z., Nagy G., Müller G., Simandi Z., Hegedüs E., Szabo G., Toth K., Nagy L., Vamosi G. Agonist binding directs dynamic competition among nuclear receptors for heterodimerization with retinoid X receptor. *J. Biol. Chem., 2020, vol. 295, no. 29, pp. 10045–10061. doi:10.1074/jbc.RA119.011614*
21. Glass C.K., Olefsky J.M. Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. *Cell Metab., 2012, vol. 15, no. 5, pp. 635–645. doi:10.1016/j.cmet.2012.04.001*
22. Haussler M.R., Whitfield G.K., Kaneko I., Haussler C.A., Hsieh D., Hsieh J.C., Jurutka P.W. Molecular mechanisms of vitamin D action. *Calcified Tissue Int., 2013, vol. 92, no. 2, pp. 77–98. doi: 10.1007/s00223-012-9619-0*
23. Hii C.S., Ferrante A. The non-genomic actions of vitamin D. *Nutrients, 2016, vol. 8, no. 3: 135. doi: 10.3390/nu8030135*
24. Hmama Z., Peña-Diaz S., Joseph S., Av-Gay Y. Immunoevasion and immunosuppression of the macrophage by Mycobacterium tuberculosis. *Immunol. Rev., 2015, vol. 261, no. 1, pp. 220–232. doi: 10.1111/imr.12268*
25. Hwang D.H., Kim J.A., Lee J.Y. Mechanisms for the activation of Toll-like receptor 2/4 by saturated fatty acids and inhibition by docosahexaenoic acid. *Eur. J. Pharmacol., 2016, vol. 785, pp. 24–35. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.04.024*
26. Jiang C., Zhu J., Liu Y., Luan X., Jiang Y., Jiang G., Fan J. The methylation state of VDR gene in pulmonary tuberculosis patients. *J. Thorac. Dis., 2017, vol. 9, no. 11, pp. 4353–4357. doi: 10.21037/jtd.2017.09.107*
27. Jo E.K., Yang C.S., Choi C.H., Harding C.V. Intracellular signalling cascades regulating innate immune responses to Mycobacteria: branching out from Toll-like receptors. *Cell Microbiol., 2007, vol. 9, no. 5, pp. 1087–1098. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.00914.x*
28. Johnston J.B., Kells P.M., Podust L.M., Ortiz de Montellano P.R. Biochemical and structural characterization of CYP124: a methyl-branched lipid omega-hydroxylase from Mycobacterium tuberculosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA, 2009, vol. 106, no. 49, pp. 20687–20692. doi: 10.1073/pnas.0907398106*
29. Kaul D., Anand P.K., Verma I. Cholesterol-sensor initiates M. tuberculosis entry into human macrophages. *Mol. Cell. Biochem., 2004, vol. 258, pp. 219–222. doi: 10.1023/b:mcbi.0000012851.42642.be*
30. Khoo A.L., Chai L.Y., Koenen H.J., Oosting M., Steinmeyer A., Zuegel U., Joosten I., Netea M.G., van der Ven A.J. Vitamin D(3) down-regulates proinflammatory cytokine response to Mycobacterium tuberculosis through pattern recognition receptors while inducing protective cathelicidin production. *Cytokine, 2011, vol. 55, no. 2, pp. 294–300. doi: 10.1016/j.cyto.2011.04.016*
31. Kleinnijenhuis J., Oosting M., Joosten L.A., Netea M.G., Van Crevel R. Innate immune recognition of Mycobacterium tuberculosis. *Clin. Dev. Immunol., 2011, vol. 2011. doi: 10.1155/2011/405310*
32. Lipin M.Y., Stepanshina V.N., Shemyakin I.G., Shinnick T.M. Association of specific mutations in katG, rpoB, rpsL and rrs genes with spoligotypes of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in Russia. *Clin. Microbiol. Infect., 2007, vol. 13, no. 6, pp. 620–626. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01711.x.*
33. Mahajan S., Dkhar H.K., Chandra V., Dave S., Nanduri R., Janmeja A.K., Agrewala J.N., Gupta P. Mycobacterium tuberculosis modulates macrophage lipid-sensing nuclear receptors PPARγ and TR4 for survival. *J. Immunol., 2012, vol. 188, no. 11, pp. 5593–603. doi: 10.4049/jimmunol.1103038*
34. Masood K.I., Rottenberg M.E., Salahuddin N., Irfan M., Rao N., Carow B., Islam M., Hussain R., Hasan Z. Expression of M. tuberculosis-induced suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1, SOCS3, FoxP3 and secretion of IL-6 associates with differing clinical severity of tuberculosis. *BMC Infect. Dis., 2013, vol. 13. doi: 10.1186/1471-2334-13-13*
35. Meyer V., Saccone D.S., Tugizimana F., Asani F.F., Jeffery T.J., Bornman L. Methylation of the vitamin D receptor (VDR) gene, together with genetic variation, race, and environment influence the signaling efficacy of the Toll-like receptor 2/1-VDR pathway. *Front. Immunol., 2017, vol. 8, no. 1048. doi: 10.3389/fimmu.2017.01048*
36. Mihaylova M.M., Shaw R.J. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat. Cell. Biol., 2011, vol. 13, no. 9, pp. 1016–1023. doi: 10.1038/ncb2329*
37. Mo S.W., Zhu C.Z., Liu X.Q., Wan H.Q., Li F.X., Deng G.F., Zhang Z.D., Chen X.C. Mechanism of Mycobacterium tuberculosis on interleukin-6 receptor 3'-untranslated region methylation in CD4+T cells. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi, 2022, vol. 45, no. 4, pp. 379–386. doi: 10.3760/cma.j.cn112147-20211206-00859*
38. Naeem M.A., Ahmad W., Tyagi R., Akram Q., Younus M., Liu X. Stealth strategies of Mycobacterium tuberculosis for immune evasion. *Curr. Issues Mol. Biol., 2021, vol. 41, pp. 597–616. doi: 10.21775/cimb.041.597*
39. Norman A.W. Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology, 2006, vol. 147, no. 12, pp. 5542–5548. doi: 10.1210/en.2006-0946*
40. Nowag A., Hartmann P. Immune response to Mycobacterium tuberculosis. *Internist (Berl.), 2016, vol. 52, no. 2, pp. 107–116. doi: 10.1007/s00108-015-0016-4*
41. Ogarkov O., Mokrousov I., Sinkov V., Zhdanova S., Antipina S., Savilov E. 'Lethal' combination of Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype and human CD209 –336G allele in Russian male population. *Infect. Genet. Evol., 2012, vol. 12, no. 4, pp. 732–736. doi: 10.1016/j.meegid.2011.10.005*
42. Park Y.K., Shin S., Ryu S., Cho S.N., Koh W.J., Kwon O.J., Shim Y.S., Lew W.J., Bai G.H. Comparison of drug resistance genotypes between Beijing and non-Beijing family strains of Mycobacterium tuberculosis in Korea. *J. Microbiol. Methods, 2005, vol. 63, no. 2, pp. 165–172. doi: 10.1016/j.mimet.2005.03.002*
43. Parks W.C., Wilson C.L., López-Boado Y.S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol., 2004, vol. 4, no. 8, pp. 617–629. doi: 10.1038/nri1418*
44. Ryan J.W., Anderson P.H., Morris H.A. Pleiotropic activities of vitamin D receptors — adequate activation for multiple health outcomes. *Clin. Biochem. Rev., 2015, vol. 36, no. 2, pp. 53–61.*
45. Saini N.K., Baena A., Ng T.W., Venkataswamy M.M., Kennedy S.C., Kunnath-Velayudhan S., Carreño L.J., Xu J., Chan J., Larsen M.H., Jacobs W.R. Jr., Porcelli S.A. Suppression of autophagy and antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis PE_PGRS47. *Nat. Microbiol., 2016, vol. 1, no. 9. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.133*
46. Sampson S.L. Mycobacterial PE/PPE proteins at the host-pathogen interface. *Clin. Dev. Immunol., 2011, vol. 2011. doi: 10.1155/2011/497203*
47. Sasindran S.J., Torrelles J.B. Mycobacterium Tuberculosis Infection and Inflammation: what is Beneficial for the Host and for the Bacterium? *Front. Microbiol., 2011, vol. 2. doi: 10.3389/fmicb.2011.00002*
48. Seth-Vollenweider T., Joshi S., Dhawan P., Sif S., Christakos S. Novel mechanism of negative regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced 25-hydroxyvitamin D3 24-hydroxylase (Cyp24a1) transcription: epigenetic modification involving cross-talk

between protein-arginine methyltransferase 5 and the SWI/SNF complex. *J. Biol. Chem., 2014, vol. 289, no. 49, pp. 33958–33970. doi: 10.1074/jbc.M114.583302*

49. Sharma G., Upadhyay S., Srilalitha M., Nandicoori V.K., Khosla S. The interaction of mycobacterial protein Rv2966c with host chromatin is mediated through non-CpG methylation and histone H3/H4 binding. *Nucleic Acids Res., 2015, vol. 43, no. 8, pp. 3922–3937. doi: 10.1093/nar/gkv261*
50. Slominski A.T., Kim T.K., Li W., Yi A.K., Postlethwaite A., Tuckey R.C. The role of CYP11A1 in the production of vitamin D metabolites and their role in the regulation of epidermal functions. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 2014, vol. 144, pp. 28–39. doi: 10.1016/j.jsbmb.2013.10.012*
51. Slominski A.T., Kim T.K., Qayyum S., Song Y., Janjetovic Z., Oak A., Slominski R.M., Raman C., Stefan J., Mier-Aguilar C.A., Atigadda V., Crossman D.K., Golub A., Bilokin Y., Tang E., Chen J.Y., Tuckey R.C., Jetten A.M., Song Y. Vitamin D and lumisterol derivatives can act on liver X receptors (LXRs). *Sci. Rep., 2021, vol. 1, no. 1. doi: 10.1038/s41598-021-87061-w*
52. Strong E.J., Ng T.W., Porcelli S.A., Lee S. Mycobacterium tuberculosis PE_PGRS20 and PE_PGRS47 Proteins Inhibit Autophagy by Interaction with Rab1A. *mSphere, 2021, vol. 6, no. 4. doi: 10.1128/mSphere.00549-21*
53. Thomas S.T., VanderVen B.C., Sherman D.R., Russell D.G., Sampson N.S. Pathway profiling in Mycobacterium tuberculosis: elucidation of cholesterol-derived catabolite and enzymes that catalyze its metabolism. *J. Biol. Chem., 2011, vol. 286, no. 51, pp. 43668–43678. doi: 10.1074/jbc.M111.313643*
54. Thurston T.L., Ryzhakov G., Bloor S., von Muhlinen N., Randow F. The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. *Nat. Immunol., 2009, vol. 11, no. 10, pp. 1215–1221. doi: 10.1038/ni.1800*
55. Vasilevskaya A.V., Yantsevich A.V., Sergeev G.V., Lemish A.P., Usanov S.A., Gilep A.A. Identification of Mycobacterium tuberculosis enzyme involved in vitamin D and 7-dehydrocholesterol metabolism. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 2017, vol. 169, pp. 202–209. doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.05.021*
56. Watson R.O., Bell S.L., MacDuff D.A., Kimmey J.M., Diner E.J., Olivas J., Vance R.E., Stallings C.L., Virgin H.W., Cox J.S. The cytosolic sensor cGAS detects Mycobacterium tuberculosis DNA to induce type I interferons and activate autophagy. *Cell Host Microbe, 2015, vol. 17, no. 6, pp. 811–819. doi: 10.1016/j.chom.2015.05.004*
57. Wilson A.S., Power B.E., Molloy P.L. DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim. Biophys. Acta, 2007, vol. 1775, no. 1, pp. 138–62. doi: 10.1016/j.bbcan.2006.08.007*
58. Wöbke T.K., Sorg B.L., Steinhilber D. Vitamin D in inflammatory diseases. *Front. Physiol., 2014, vol. 5: 244. doi: 10.3389/fphys.2014.00244*
59. Wu Y., Lin X., Song F., Xue D., Wang Y. Vitamin D3 promotes autophagy in THP-1 cells infected with Mycobacterium tuberculosis. *Exp. Ther. Med., 2022, vol. 23, no. 3: 240. doi:10.3892/etm.2022.11165*
60. Yuk J.M., Shin D.M., Lee H.M., Yang C.S., Jin H.S., Kim K.K., Lee Z.W., Lee S.H., Kim J.M., Jo E.K. Vitamin D induces autophagy in human monocytes/macrophage via cathelicldin. *Cell Host Microbe, 2009, vol. 6, no. 3, pp. 231–243. doi: 10.1016/j.chom.2009.08.004*
61. Zink A.R., Sola C., Reischl U., Grabner W., Rastogi N., Wolf H., Nerlich A.G. Characterization of Mycobacterium tuberculosis complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping. *J. Clin. Microbiol., 2003, vol. 41, no. 1, pp. 359–367. doi: 10.1128/JCM.41.1.359-367.2003*

Авторы:

Лавряшина М.Б., д.б.н., доцент, зав. кафедрой молекулярной и клеточной биологии ФГБОУ ВО Кемеровский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Кемерово, Россия;

Имекина Д.О., ассистент кафедры молекулярной и клеточной биологии ФГБОУ ВО Кемеровский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Кемерово, Россия;

Тхоренко Б.А., аспирант кафедры генетики и фундаментальной медицины ФГБОУ ВО Кемеровский государственный университет, г. Кемерово, Россия;

Ульянова М.В., к.б.н., доцент кафедры молекулярной и клеточной биологии ФГБОУ ВО Кемеровский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Кемерово, Россия;

Мейер А.В., к.б.н., доцент кафедры молекулярной и клеточной биологии ФГБОУ ВО Кемеровский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Кемерово, Россия;

Тарасова О.Л., к.м.н., доцент, доцент кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО Кемеровский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Кемерово, Россия;

Сизова А.С., студент стоматологического факультета ФГБОУ ВО Кемеровский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Кемерово, Россия;

Брюхачева Е.О., аспирант кафедры фтизиатрии ФГБОУ ВО Кемеровский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Кемерово, Россия;

Пьянзова Т.В., д.м.н., доцент, заведующий кафедрой фтизиатрии ФГБОУ ВО Кемеровский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Кемерово, Россия.

Authors:

Lavriashina M.B., DSc (Biology), Associate Professor, Head of the Department of Molecular and Cellular Biology, Kemerovo State Medical University, Ministry of Health of Russian Federation, Kemerovo, Russian Federation;

Imekina D.O., Assistant of the Department of Molecular and Cellular Biology, Kemerovo State Medical University, Ministry of Health of Russian Federation, Kemerovo, Russian Federation;

Tkhorenko B.A., Postgraduate Student, Department of Genetics and Fundamental Medicine, Kemerovo State University, Ministry of Health of Russian Federation, Kemerovo, Russian Federation;

Ulyanova M.V., PhD (Biology), Associate Professor Department of Molecular and Cellular Biology, Kemerovo State Medical University, Ministry of Health of Russian Federation, Kemerovo, Russian Federation;

Meyer A.V., PhD (Biology), Associate Professor Department of Molecular and Cellular Biology, Kemerovo State Medical University, Ministry of Health of Russian Federation, Kemerovo, Russian Federation;

Tarasova O.L., PhD (Medicine), Associate Professor, Associate Professor of the Department of Pathological Physiology, Kemerovo State Medical University, Ministry of Health of Russian Federation, Kemerovo, Russian Federation;

Sizova A.S., Student of the Dental Faculty, Kemerovo State Medical University, Ministry of Health of Russian Federation, Kemerovo, Russian Federation;

Bryukhacheva E.O., Postgraduate Student, Department of Phthisiology, Kemerovo State Medical University, Ministry of Health of Russian Federation, Kemerovo, Russian Federation;

Pyanzova T.V., DSc (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Phthisiology, Kemerovo State Medical University, Ministry of Health of Russian Federation, Kemerovo, Russian Federation.

Поступила в редакцию 17.09.2022
Отправлена на доработку 11.02.2023
Принята к печати 04.03.2023

Received 17.09.2022
Revision received 11.02.2023
Accepted 04.03.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 2, pp. 243–256

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 2, с. 243–256

ИЗУЧЕНИЕ МОРФОСТРУКТУРНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ХЛОРСОДЕРЖАЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ 5-,6-,7-АМИНОИНДОЛОВ С ПОМОЩЬЮ СКАНИРУЮЩЕГО ЭЛЕКТРОННОГО МИКРОСКОПА

А.А. Масейкина[1], И.С. Степаненко[2], Т.Н. Платкова[1], А.И. Кирютина[1], В.С. Малышева[1]

[1] *ФГБОУ ВО Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, г. Саранск, Россия*
[2] *ФГБОУ ВО Волгоградский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Волгоград, Россия*

Резюме. Клеточная стенка и мембраны грамположительных и грамотрицательных бактерий обеспечивают физический, осмотический и метаболический барьер между внутренним содержимым бактериальной клетки и внешней средой. Наблюдение за изменениями целостности бактериальной структуры с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) может помочь прояснить детальные механизмы гибели клеток. Цель исследования — провести анализ морфологических изменений микробных клеток под воздействием новых соединений с противомикробной активностью — хлорсодержащих производных 5-,6-,7-аминоиндолов с помощью СЭМ. Настоящее исследование проводили с использованием штаммов *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, полученных от больных с неспецифическими заболеваниями органов дыхания, мочевыводящих путей, кишечника, с различной чувствительностью к традиционно используемым антимикробным препаратам. В результате исследуемые хлорметилсодержащие соединения индольного ряда показали свою биологическую активность, а именно — противомикробную. Контрольные клетки были морфологически правильными и типичными. Статистический анализ морфометрии поверхности клеток в контрольных и опытных образцах не выявил существенных изменений размеров под воздействием соединений с лабораторным шифром T1, T4, T7 и T12. При этом по сравнению с контрольными необработанными клетками *P. aeruginosa*, *S. aureus* и *E. coli* обработка хлорзамещенными производными 5-,6-,7-аминоиндолов вызывала явные морфологические изменения, о чем свидетельствует об ухудшении состояния клеточной стенки. У *P. aeruginosa* под воздействием T7 и T12 наблюдались филаментные клетки. Появление длинных нитей может быть связано со стрессом, который испытывает клетка после воздействия исследуемых соединений. Считается, что образование таких филаментов у бактерий в условиях стресса является результатом дефектов клеточного деления, особенно при отделении дочерних клеток. Есть данные, согласно которым при подавлении синтеза ДНК бактерии изменяется ее морфология: она становится длиннее, не вступая в фазу деления.

Адрес для переписки:
Масейкина Алена Александровна
430005, Россия, г. Саранск, Большевистская ул., 68,
ФГБОУ ВО Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева.
Тел.: 8 (951) 343-54-08. E-mail: minibat@mail.ru

Contacts:
Alena A. Maseykina
430005, Russian Federation, Saransk, Bolshevistskaya str., 68,
National Research Ogarev Mordovia State University.
Phone: +7 (951) 343-54-08. E-mail: minibat@mail.ru

Для цитирования:
Масейкина А.А., Степаненко И.С., Платкова Т.Н., Кирютина А.И., Малышева В.С. Изучение морфоструктурных повреждений бактериальных клеток под воздействием хлорсодержащих производных 5-,6-,7-аминоиндолов с помощью сканирующего электронного микроскопа // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 2. С. 243–256. doi: 10.15789/2220-7619-MDT-2047

Citation:
Maseykina A.A., Stepanenko I.S., Platkova T.N., Kiryutina A.I., Malysheva V.S. Morphostructural damage to bacterial cells exposed to chlorine-containing derivatives of 5-,6-,7-aminoindoles assessed by scanning electron microscope // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 2, pp. 243–256. doi: 10.15789/2220-7619-MDT-2047

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-MDT-2047

Обработка T1, T7 и T12 приводила к деградации клеточной стенки *P. aeruginosa*, в то время как обработка T4 вызывала образование пор на поверхности клетки. В этом исследовании было продемонстрировано, что под действием T1, T4, T7 и T12 происходят заметные морфологические изменения клеточных стенок *S. aureus*, которые в конечном итоге приводят к деформации микробных клеток. Обработка клеток *E. coli* T1, T4, T7 и T12 при концентрации 500 мкг/мл вызывала лизис клеток, хотя нормальные клетки также были обнаружены. Появление клеточных обломков вокруг целых клеток *E. coli* указывает на повреждение мембраны, которое, вероятно, приводит к изменению осмотического давления. Использование СЭМ подтвердило данные об антимикробной активности хлорзамещенных производных 5-,6-,7-аминоиндолов.

Ключевые слова: *морфоструктурные изменения бактерий, хлорсодержащие производные 5-,6-,7-аминоиндолов, сканирующая электронная микроскопия, клеточная стенка, антимикробная активность, ESKAPE-патогены.*

MORPHOSTRUCTURAL DAMAGE TO BACTERIAL CELLS EXPOSED TO CHLORINE-CONTAINING DERIVATIVES OF 5-,6-,7-AMINOINDOLES ASSESSED BY SCANNING ELECTRON MICROSCOPE

Maseykina A.A.[a], Stepanenko I.S.[b], Platkova T.N.[a], Kiryutina A.I.[a], Malysheva V.S.[a]

[a] *National Research Mordovia State University, Saransk, Russian Federation*
[b] *Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation*

Abstract. The cell wall and membranes of Gram-positive and Gram-negative bacteria provide a physical, osmotic, and metabolic barrier between the internal contents of the bacterial cell and the external environment. Observation of changes in the integrity of the bacterial structure using a scanning electron microscope (SEM) can help elucidate the detailed mechanisms of cell death. The aim of the study was to analyze the morphological changes in microbial cells exposed to new compounds with antimicrobial activity — chlorine-containing derivatives of 5-,6-,7-aminoindoles using SEM. *Methods.* The present study was carried out using strains of *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli* obtained from patients with nonspecific diseases of the respiratory, urinary tract, and intestines with different sensitivities to traditionally used antimicrobial drugs. *Results.* As a result, the studied chloromethyl-containing compounds of the indole series showed own biological activity, namely antimicrobial. Control cells were morphologically correct and typical. Statistical analysis of cell surface morphometry in control and experimental samples did not reveal significant changes in size after exposure to compounds with laboratory codes T1, T4, T7 and T12. At the same time, compared with control untreated cells of *P. aeruginosa, S. aureus* and *E. coli*, treatment with chlorine-substituted derivatives of 5-,6-,7-aminoindoles caused obvious morphological changes, which indicates a deteriorated state of the cell wall. Filamentous cells were observed in *P. aeruginosa* exposure to T7 and T12. The appearance of long filaments may be associated with the stress experienced by the cell after exposure to the compounds under study. It is believed that the formation of such filaments in bacteria under stress conditions results from defects in cell division, especially in the separation of daughter cells. There are data according to which, when DNA synthesis is suppressed, a bacterium changes its morphology, becomes longer, without reaching cell division. Treatment with T1, T7 and T12 resulted in degradation of the *P. aeruginosa* cell wall, while treatment with T4 caused the formation of pores on the cell surface. In this study, microscopy showed marked morphological changes in the cell walls of *S. aureus*, which led to deformation of the cell wall under the influence of T1, T4, T7 and T12. Treatment of *E. coli* T1, T4, T7 and T12 cells at a concentration of 500 μg/ml caused cell lysis, although normal cells were also found. The appearance of cellular debris around whole E. coli cells indicates membrane damage, which probably leads to a change in osmotic pressure. *Conclusion.* The results using SEM confirmed the data on the antimicrobial activity of chlorine-substituted derivatives of 5-,6-,7-aminoindoles.

Key words: *morphostructural changes in bacteria, chlorine-containing derivatives of 5-,6-,7-aminoindoles, scanning electron microscopy, cell wall, antimicrobial activity, ESKAPE pathogens.*

Введение

Разработка новых противомикробных соединений или других альтернативных средств для борьбы с возбудителями инфекционных заболеваний является важной задачей здравоохранения [1].

Антимикробная активность большинства классов противомикробных соединений направлена на какую-то уникальную особенность строения бактерий или их метаболических процессов. Среди механизмов действия можно выделить: ингибирование синтеза клеточной стенки, нарушение структуры или функции клеточной мембраны, ингибирование структуры и функции нуклеиновых кислот, ингибирование синтеза белка и остановка основных метаболических путей [30].

Целостность клеточной структуры очень важна для жизнедеятельности бактерий [36]. Клеточная стенка и мембраны грамположительных и грамотрицательных бактерий обеспечивают физический, осмотический и метаболический барьер между внутренним содержи-

мым бактериальной клетки и внешней средой. Несомненно, что для всех этих функций необходима целостность мембраны, и ее нарушение может прямо или косвенно вызвать метаболическую дисфункцию и гибель клеток, помимо собственно образования пор. Наблюдение за изменением целостности бактериальной структуры с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) может помочь прояснить детальные механизмы гибели клеток [21, 22].

В настоящем исследовании мы использовали изоляты *S. aureus, P. aeruginosa, E. coli*, так как эти патогены наиболее часто представляют собой терапевтическую проблему из-за формирующейся устойчивости к противомикробным препаратам [8, 9, 15, 18].

P. aeruginosa один из наиболее важных клинических оппортунистических патогенов [16, 17, 18, 39]. Он является возбудителем внутрибольничных, раневых инфекций, инфекций мочевыводящих путей и ЛОР-органов, острых и хронических инфекций легких у пациентов с кистозным фиброзом и т. д. [4, 20, 24, 29, 31].

Инфекции, вызванные *P. aeruginosa*, продолжают представлять терапевтическую проблему из-за лекарственной устойчивости, развивающейся во время терапии, и обусловленной низкой проницаемостью его наружной мембраны. Также наличие у *P. aeruginosa* клеточного (эффлюксного) насоса для оттока лекарств и β-лактамаз типа AmpC приводит к высоким показателям заболеваемости и смертности [13, 19, 32].

S. aureus является клиническим патогеном, вызывающим инфекции как у людей, так и у животных, начиная от поверхностных инфекций и заканчивая жизнеугрожающими инвазивными инфекциями [14, 25, 33].

S. aureus признан главным возбудителем внутрибольничных инфекций, приводящих к заболеваемости и смертности среди госпитализированных пациентов. Отчасти это связано с его способностью прилипать к поверхности медицинского оборудования и образовывать биопленку, представляющую собой многослойную структуру, состоящую из бактериальных сообществ, внедренных во внеклеточный матрикс [38].

E. coli является основной причиной энтерита, инфекций мочевыводящих путей, септицемии и других клинических инфекций, в том числе неонатального менингита. *E. coli* также часто вызывает диарею у домашних и сельскохозяйственных животных. Лечение инфекций, вызванных кишечной палочкой, находится под угрозой из-за появления устойчивости к противомикробным препаратам [26, 27, 35].

Описанные выше бактерии относятся к «ESKAPE»-патогенам, которые способны формировать изоляты с множественной лекарственной устойчивостью [9].

Исходя из вышеизложенного, целью нашего исследования был анализ морфологических изменений микробных клеток под воздействием новых соединений с противомикробной активностью — хлорсодержащих производных 5-,6-,7-аминоиндолов — с использованием СЭМ.

Материалы и методы

В качестве тестируемых соединений были использованы хлорзамещенные производные 5-,6-,7-аминоиндолов (табл. 1). Исследуемые соединения разработаны и получены на кафедре химии, технологии и методики обучения ФГБОУ ВО «МГПУ им. М.Е. Евсевьева», г. Саранск. Ранее была доказана противомикробная активность хлорсодержащих соединений индольного ряда [6].

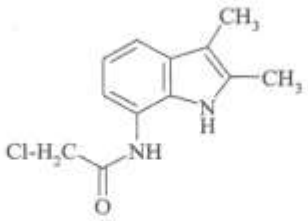
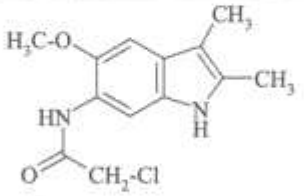
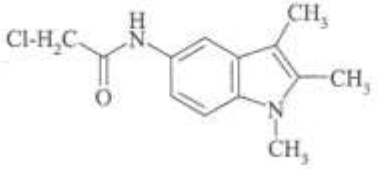
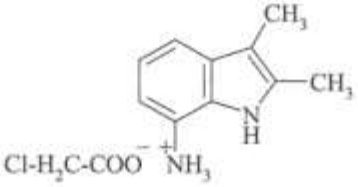
Опытные штаммы микроорганизмов с различной чувствительностью к традиционно используемым антимикробным препаратам получены от больных с неспецифическими заболеваниями органов дыхания, мочевыводящих путей, кишечника.

Верификацию опытных штаммов микроорганизмов осуществляли бактериологическими методами по классической методике [3, 5, 7].

Опытные штаммы *P. aeruginosa*, *S. aureus* и *E. coli* выращивали в течение ночи в бульоне LB. Суспензии клеток центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 мин. Осадок дважды промывали стерильным фосфатным буфером. Приблизительно 2×10^8 микробных клеток каждого опытного штамма переносили в пробирку Эппендорф на 1,5 мл и инкубировали с исследуемыми соединениями заданной концентрации (500 мкг/мл) в течение часа. Концентрацию микробных клеток вычисляли по оптической плотности. После инкубации клетки дважды промывали фосфатным буфером и центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 мин. Затем фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида в течение 15 мин. После фиксации клетки снова отмывали фосфатным буфером и постепенно обезвоживали путем последовательных погружений в растворы этанола возрастающих концентраций (30, 50, 70, 90 и 96%). Каждый этап промывки и обезвоживания длился 10 мин. Затем клетки обезвоживали в чистом ацетоне (99,8%). Образцы бактерий высушивали в критической точке на установке Leica CPD 300, напыляли золотом на Quorum 150 RESplus и исследовали на сканирующем электронном микроскопе Tescan Mira 3. Рабочее расстояние и ускоряющее напряжение регулировались для получения подходящего увеличения. Для каждого препарата наблюдалось около 100 бактериальных клеток [28].

Все данные представлены в виде средних значений ± стандартное отклонение в трех по-

Таблица 1. Молекулярные структуры исследуемых производных 5-,6-,7-аминоиндолов
Table 1. Molecular structures of the studied derivatives of 5-, 6-, 7-aminoindoles

Структурная формула Structural formula	Название, лабораторный шифр Name, laboratory code
	**2-хлор-N-(2,3-диметил-1H-индол-7-ил)ацетамид (Т-1)** 2-chloro-N-(2,3-dimethyl-1H-indol-7-yl)acetamide (T-1)
	**2-хлор-N-(5-метокси-2,3-диметил-1H-индол-6-ил)ацетамид (Т-4)** 2-chloro-N-(5-methoxy-2,3-dimethyl-1H-indol-6-yl)acetamide (T-4)
	**2-хлор-N-(1,2,3-триметил-1H-индол-5-ил)ацетамид (Т-7)** 2-chloro-N-(1,2,3-trimethyl-1H-indol-5-yl)acetamide (T-7)
	**Монохлорацетат-2,3-диметил-1H-индол-7-аммония (Т-12)** Monochloroacetate-2,3-dimethyl-1H-indole-7-ammonium (T-12)

вторностях. Статистическая значимость полученных различий считалась достоверной при значении $p \leq 0,05$. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel версия 16.0.

Результаты

В контрольных образцах клетки *P. aeruginosa* длинные и неповрежденные (рис. 1А–В, 4А–В, 7А–В, 10А–В). Клетки *S. aureus* заключены в межклеточный матрикс синтезированных ими полимеров, есть участки с толстой, плотной и полностью сформировавшейся биопленкой, состоящей из многослойных бактериальных клеток (рис. 2А–В, 5А–В, 8А–В, 11А–В), клетки *E. coli* представляли собой типичные палочковидные бактерии длиной 1,22–1,88 мкм, шириной 0,37–0,43 мкм (рис. 3А–В, 6А–В, 9А–В, 12А–В).

Клетки *P. aeruginosa*, обработанные 2-хлор-N-(2,3-диметил-1H-индол-7-ил)ацетамидом (Т1), короткие и более компактные. Поверхность обработанных клеток выглядит шероховатой и морщинистой по сравнению с поверхностью необработанных клеток. Наблюдается образование пузырьков и везикул на наружной мембране. Клетки после воздействия Т1 имеют отверстия, вмятины и глубокие кратеры. Форма и размер клеток практически не изменились (рис. 1Г–Е).

В обработанных Т1 клетках *S. aureus* межклеточный матрикс поврежден или отсутствует, встречаются лопнувшие клетки. Некоторые клетки имеют сформированную перегородку деления. Форма и размер клеток практически не изменились (рис. 2Г–Е).

Клетки *E. coli* после воздействия исследуемого соединения Т1 имеют отверстия, вмятины и глубокие кратеры. Встречаются полностью лизированные клетки, тургор неразрушенных клеток нарушен. Форма и размер клеток практически не изменились (рис. 3Г–Е).

Статистический анализ морфометрии поверхности клеток в контрольных и опытных образцах не выявил существенных изменений размеров под воздействием Т1 (табл. 2).

Поверхность обработанных 2-хлор-N-(5-метокси-2,3-диметил-1H-индол-6-ил)ацетамидом (Т4) клеток *P. aeruginosa* практически не от-

личается от поверхности клеток в контроле. Встречаются единичные поры на поверхности клеток, недоразвитые мелкие клетки, обломки оторвавшихся клеток. Форма и размер клеток практически не изменились (рис. 4Г–Е).

В обработанных Т4 клетках *S. aureus,* помимо гомогенного вещества, в больших количествах содержатся частицы зернистой формы, расположенные вокруг клеток *S. aureus.* Форма и размер обработанных клеток практически не изменились. Некоторые клетки имеют сформированную перегородку деления (рис. 5Г–Е).

Поверхность клеток *E. coli*, обработанных Т4, выглядит шероховатой и морщинистой, содержит вмятины по сравнению с поверхностью необработанных клеток. Отмечается полиморфизм клеток, вокруг клеток визуализируются мелкие гранулярные компоненты (рис. 6Г–Е).

Статистический анализ морфометрии поверхности клеток в контрольных и опытных образцах не выявил существенных изменений размеров под воздействием Т4 (табл. 3).

Некоторые клетки *P. aeruginosa*, обработанные 2-хлор-N-(1,2,3-триметил-1Н-индол-5-ил) ацетамидом (Т7), имеют длинную нитевидную форму (рис. 7Г–Д). Клеточная стенка части клеток *P. aeruginosa* отходит от клеточной мембраны (рис. 7Д–Е). Встречаются лопнувшие клетки, из полости которых происходит отток внутриклеточного материала (рис. 7Д).

В обработанных Т7 клетках *S. aureus,* помимо гомогенного вещества, содержатся в больших количествах гранулярные соединения. Вокруг клеток *S. aureus* наблюдается большое количество клеточных обломков, обработанные клетки слипаются (рис. 8Г–Е).

Поверхность клеток *E. coli*, обработанная соединением Т7, по сравнению с поверхностью необработанных клеток выглядит шероховатой и морщинистой, содержит вмятины. Наблюдается клеточный полиморфизм, вокруг клеток определяются мелкие гранулярные компоненты. Отмечены потеря тургорного давления и лизис клеток (рис. 9Г–Е).

Таблица 2. Размеры поверхности бактериальных клеток при воздействии соединения с лабораторным шифром Т1 (500 мкг/мл)

Table 2. Surface dimensions of bacterial cells exposed to a compound with laboratory code T1 (500 µg/mL)

Исследуемый микроорганизм Investigated microorganism	**Измеряемые параметры** Measured parameters	
	Длина, мкм Length, µm	**Ширина, мкм** Width, µm
P. aeruginosa	1,80±0,39	0,66±0,02
***P. aeruginosa* (control)**	2,10±0,44	0,66±0,03
S. aureus	0,69±0,02	0,69±0,02
***S. aureus* (control)**	0,66±0,04	0,66±0,05
E. coli	1,23±0,18	0,41±0,06
***E. coli* (control)**	1,45±0,28	0,40±0,02

Таблица 3. Размеры поверхности бактериальных клеток при воздействии соединения с лабораторным шифром Т4 (500 мкг/мл)

Table 3. Surface dimensions of bacterial cells exposed to a compound with laboratory code T4 (500 µg/mL)

Исследуемый микроорганизм Investigated microorganism	**Измеряемые параметры** Measured parameters	
	Длина, мкм Length, µm	**Ширина, мкм** Width, µm
P. aeruginosa	2,45±0,65	0,62±0,03
***P. aeruginosa* (control)**	2,10±0,44	0,66±0,03
S. aureus	0,59±0,10	0,59±0,10
***S. aureus* (control)**	0,66±0,04	0,66±0,05
E. coli	1,31±0,40	0,40±0,06
***E. coli* (control)**	1,45±0,28	0,40±0,02

Таблица 4. Размеры поверхности бактериальных клеток при воздействии соединения с лабораторным шифром Т7 (500 мкг/мл)

Table 4. Surface dimensions of bacterial cells exposed to the compound with laboratory code T7 (500 µg/mL)

Исследуемый микроорганизм Investigated microorganism	**Измеряемые параметры** Measured parameters	
	Длина, мкм Length, µm	**Ширина, мкм** Width, µm
P. aeruginosa	2,11±0,53	0,64±0,02
***P. aeruginosa* (control)**	2,10±0,44	0,66±0,03
S. aureus	0,56±0,06	0,56±0,06
***S. aureus* (control)**	0,66±0,04	0,66±0,05
E. coli	1,14±0,19	0,41±0,05
***E. coli* (control)**	1,45±0,28	0,40±0,02

Таблица 5. Размеры поверхности бактериальных клеток при воздействии соединения с лабораторным шифром Т12 (500 мкг/мл)

Table 5. Surface dimensions of bacterial cells exposed to a compound with laboratory code T12 (500 µg/mL)

Исследуемый микроорганизм Investigated microorganism	**Измеряемые параметры** Measured parameters	
	Длина, мкм Length, µm	**Ширина, мкм** Width, µm
P. aeruginosa	2,01±0,79	0,66±0,04
***P. aeruginosa* (control)**	2,10±0,44	0,66±0,03
S. aureus	0,63±0,07	0,63±0,07
***S. aureus* (control)**	0,66±0,04	0,66±0,05
E. coli	1,39±0,44	0,40±0,01
***E. coli* (control)**	1,45±0,28	0,40±0,02

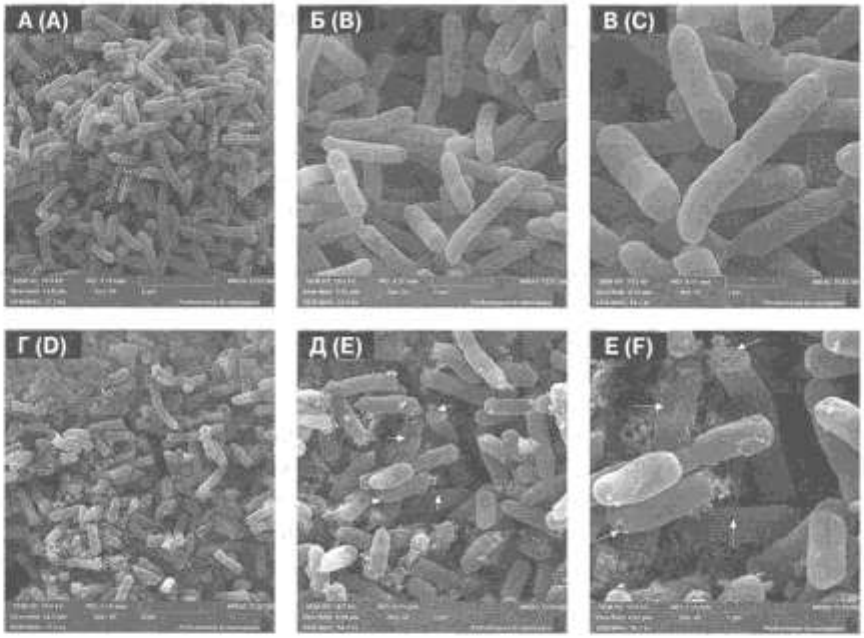


Рисунок 1. Морфоструктурные изменения *P. aeruginosa* под воздействием 2-хлор-N-(2,3-диметил-1H-индол-7-ил)ацетамида (Т-1)

Figure 1. Morphostructural changes in *P. aeruginosa* exposed to 2-chloro-N-(2,3-dimethyl-1H-indol-7-yl) acetamide (T-1)

Примечание. А, Б, В — интактные клетки *P. aeruginosa* без обработки исследуемым соединением; Г, Д, Е — клетки *P. aeruginosa* после воздействия исследуемым соединением.

Note. A, B, C — intact *P. aeruginosa* cells without treatment with the test compound; D, E, F — *P. aeruginosa* cells after exposure to the test compound.

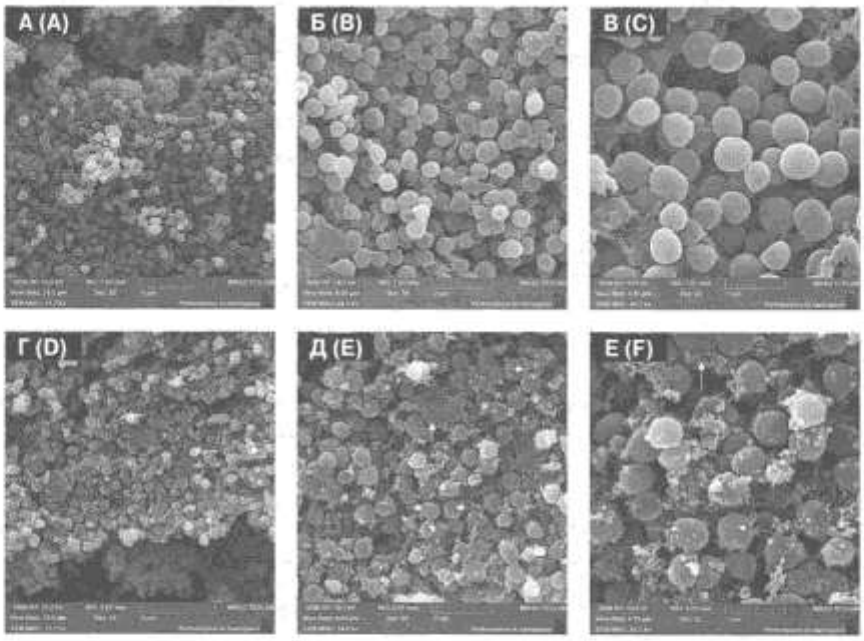


Рисунок 2. Морфоструктурные изменения *S. aureus* под воздействием 2-хлор-N-(2,3-диметил-1H-индол-7-ил)ацетамида (Т-1)

Figure 2. Morphostructural changes in *S. aureus* exposed to 2-chloro-N-(2,3-dimethyl-1H-indol-7-yl)acetamide (T-1)

Примечание. А, Б, В — интактные клетки *S. aureus* без обработки исследуемым соединением; Г, Д, Е — клетки *S. aureus* после воздействия исследуемым соединением.

Note. A, B, C — intact *S. aureus* cells without treatment with the test compound; D, E, F — *S. aureus* cells after exposure to the test compound.

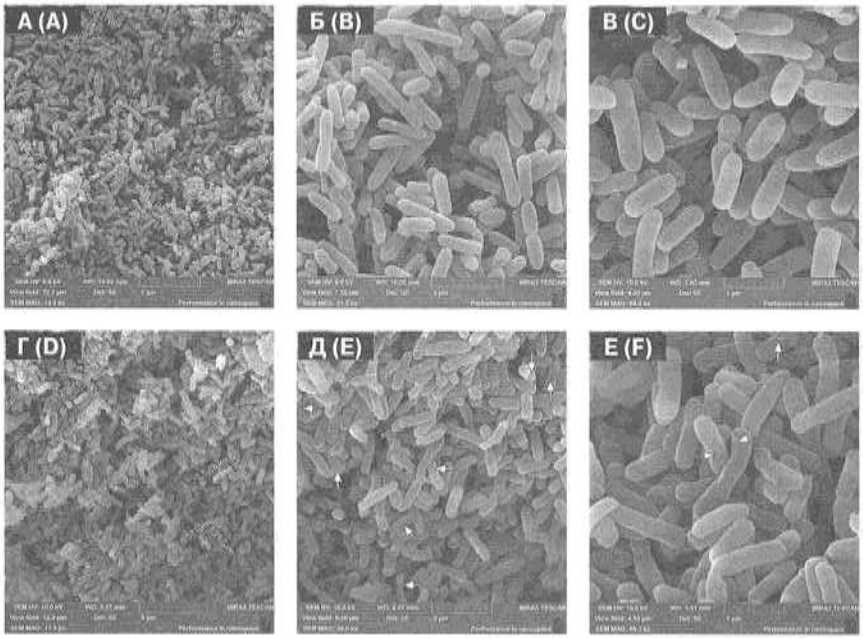


Рисунок 3. Морфоструктурные изменения *E. coli* под воздействием 2-хлор-N-(2,3-диметил-1H-индол-7-ил)ацетамида (Т-1)

Figure 3. Morphostructural changes in *E. coli* exposed to 2-chloro-N-(2,3-dimethyl-1H-indol-7-yl)acetamide (T-1)

Примечание. А, Б, В — интактные клетки *E. coli* без обработки исследуемым соединением; Г, Д, Е — клетки *E. coli* после воздействия исследуемым соединением.

Note. A, B, C — intact *E. coli* cells without test compound treatment; D, E, F — *E. coli* cells after exposure to the test compound.

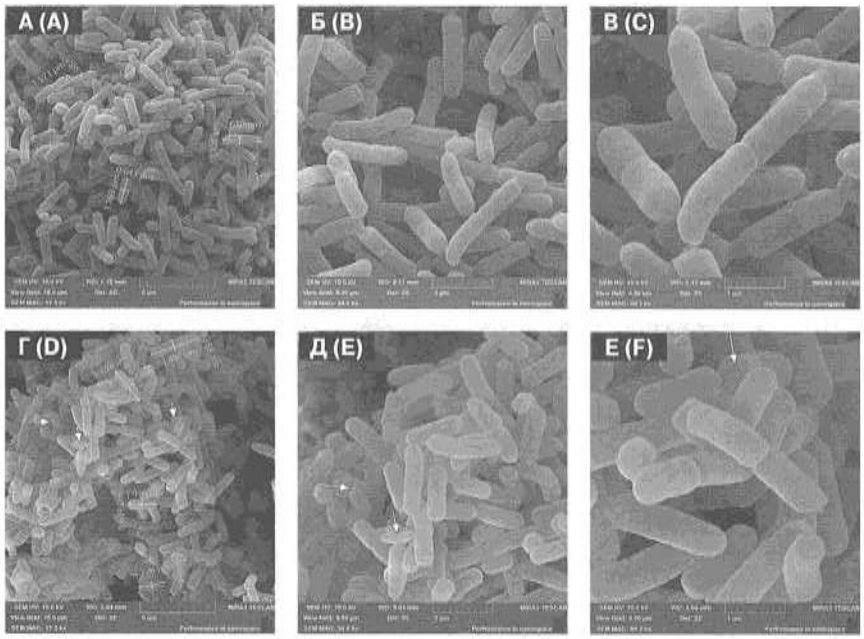


Рисунок 4. Морфоструктурные изменения *P. aeruginosa* под воздействием 2-хлор-N-(5-метокси-2,3-диметил-1H-индол-6-ил)ацетамида (Т-4)

Figure 4. Morphostructural changes in *P. aeruginosa* exposed to 2-chloro-N-(5-methoxy-2,3-dimethyl-1H-indol-6-yl) acetamide (T-4)

Примечание. А, Б, В — интактные клетки *P. aeruginosa* без обработки исследуемым соединением; Г, Д, Е — клетки *P. aeruginosa* после воздействия исследуемым соединением.

Note. A, B, C — intact *P. aeruginosa* cells without treatment with the test compound; D, E, F — *P. aeruginosa* cells after exposure to the test compound.

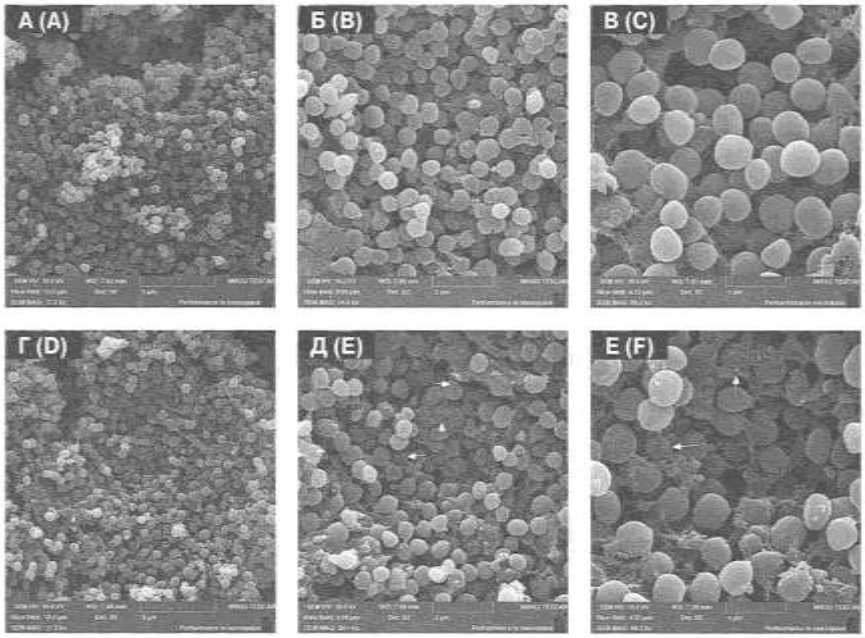


Рисунок 5. Морфоструктурные изменения *S. aureus* под воздействием 2-хлор-N-(5-метокси-2,3-диметил-1Н-индол-6-ил)ацетамида (Т-4)

Figure 5. Morphostructural changes in *S. aureus* exposed to 2-chloro-N-(5-methoxy-2,3-dimethyl-1H-indol-6-yl) acetamide (T-4)

Примечание. А, Б, В — интактные клетки *S. aureus* без обработки исследуемым соединением; Г, Д, Е — клетки *S. aureus* после воздействия исследуемым соединением.

Note. A, B, C — intact *S. aureus* cells without treatment with the test compound; D, E, F — *S. aureus* cells after exposure to the test compound.

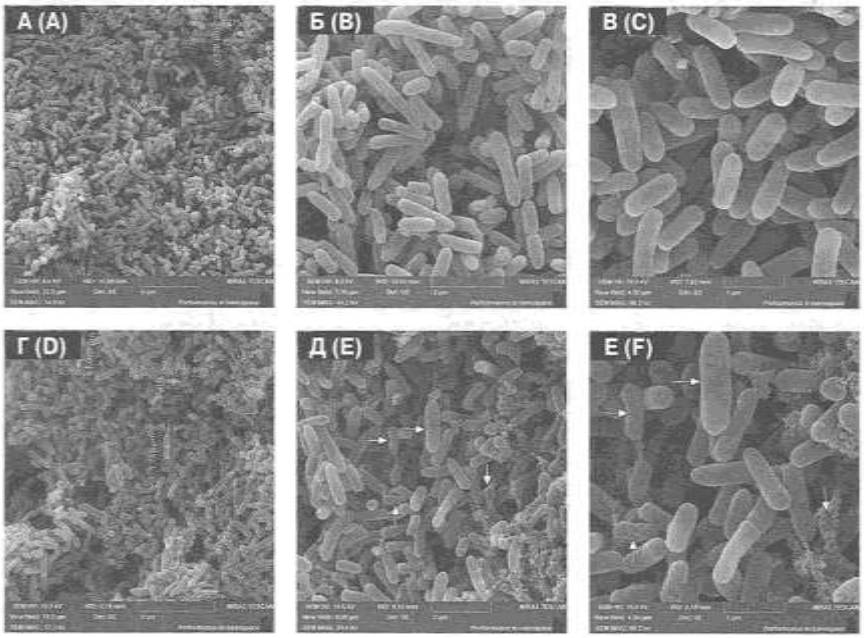


Рисунок 6. Морфоструктурные изменения *E. coli* под воздействием 2-хлор-N-(5-метокси-2,3-диметил-1Н-индол-6-ил)ацетамида (Т-4)

Figure 6. Morphostructural changes in *E. coli* exposed to 2-chloro-N-(5-methoxy-2,3-dimethyl-1H-indol-6-yl) acetamide (T-4)

Примечание. А, Б, В — интактные клетки *E. coli* без обработки исследуемым соединением; Г, Д, Е — клетки *E. coli* после воздействия исследуемым соединением.

Note. A, B, C — intact *E. coli* cells without test compound treatment; D, E, F — *E. coli* cells after exposure to the test compound.

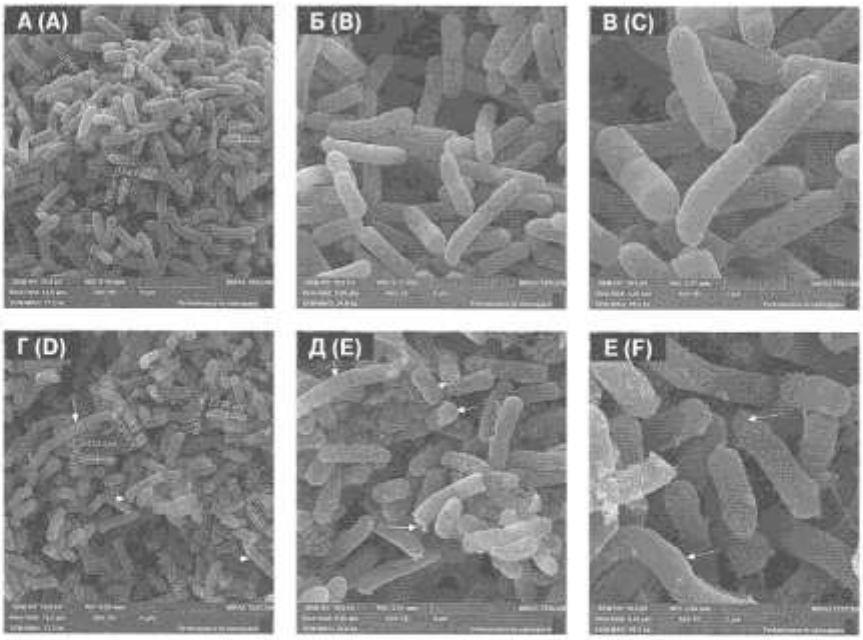


Рисунок 7. Морфоструктурные изменения *P. aeruginosa* под воздействием 2-хлор-N-(1,2,3-триметил-1H-индол-5-ил)ацетамида (Т-7)

Figure 7. Morphostructural changes in *P. aeruginosa* exposed to 2-chloro-N-(1,2,3-trimethyl-1H-indol-5-yl) acetamide (T-7)

Примечание. А, Б, В — интактные клетки *P. aeruginosa* без обработки исследуемым соединением; Г, Д, Е — клетки *P. aeruginosa* после воздействия исследуемым соединением.

Note. A, B, C — intact *P. aeruginosa* cells without treatment with the test compound; D, E, F — *P. aeruginosa* cells after exposure to the test compound.

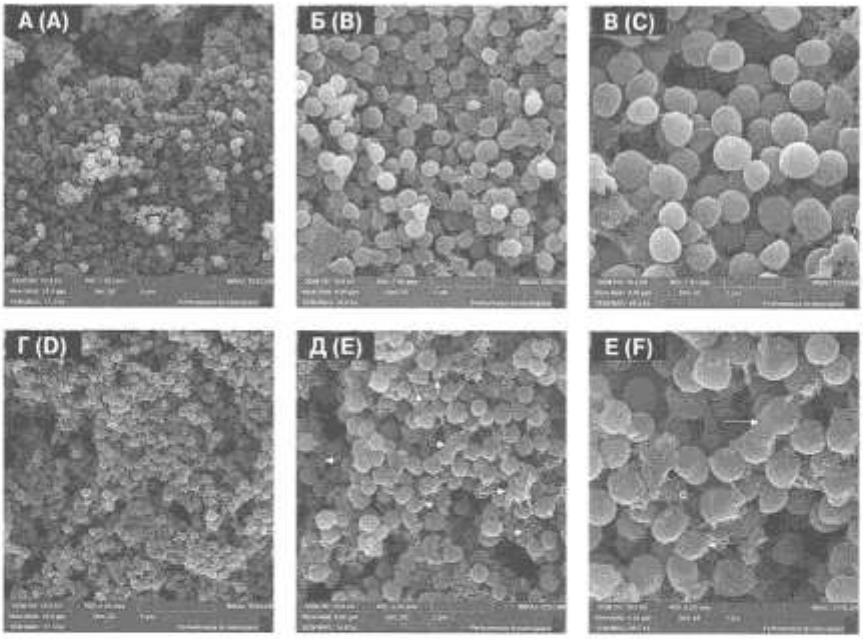


Рисунок 8. Морфоструктурные изменения *S. aureus* под воздействием 2-хлор-N-(1,2,3-триметил-1H-индол-5-ил)ацетамида (Т-7)

Figure 8. Morphostructural changes in *S. aureus* exposed to 2-chloro-N-(1,2,3-trimethyl-1H-indol-5-yl)acetamide (T-7)

Примечание. А, Б, В — интактные клетки *S. aureus* без обработки исследуемым соединением; Г, Д, Е — клетки *S. aureus* после воздействия исследуемым соединением.

Note. A, B, C — intact *S. aureus* cells without treatment with the test compound; D, E, F — *S. aureus* cells after exposure to the test compound.

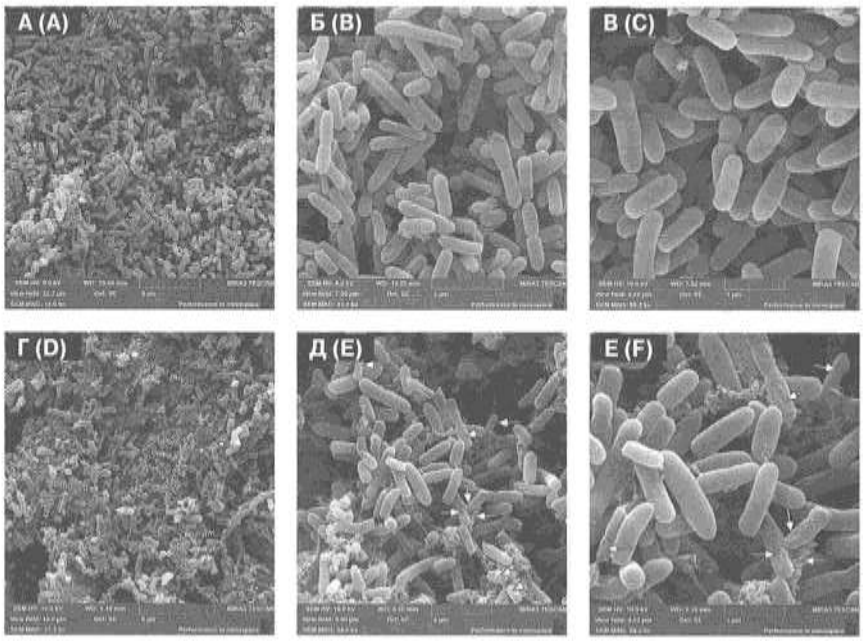


Рисунок 9. Морфоструктурные изменения *E. coli* под воздействием 2-хлор-N-(1,2,3-триметил-1Н-индол-5-ил)ацетамида (Т-7)

Figure 9. Morphostructural changes in *E. coli* exposed to 2-chloro-N-(1,2,3-trimethyl-1H-indol-5-yl)acetamide (T-7)

Примечание. А, Б, В — интактные клетки *E. coli* без обработки исследуемым соединением; Г, Д, Е — клетки *E. coli* после воздействия исследуемым соединением.

Note. A, B, C — intact *E. coli* cells without test compound treatment; D, E, F — *E. coli* cells after exposure to the test compound.

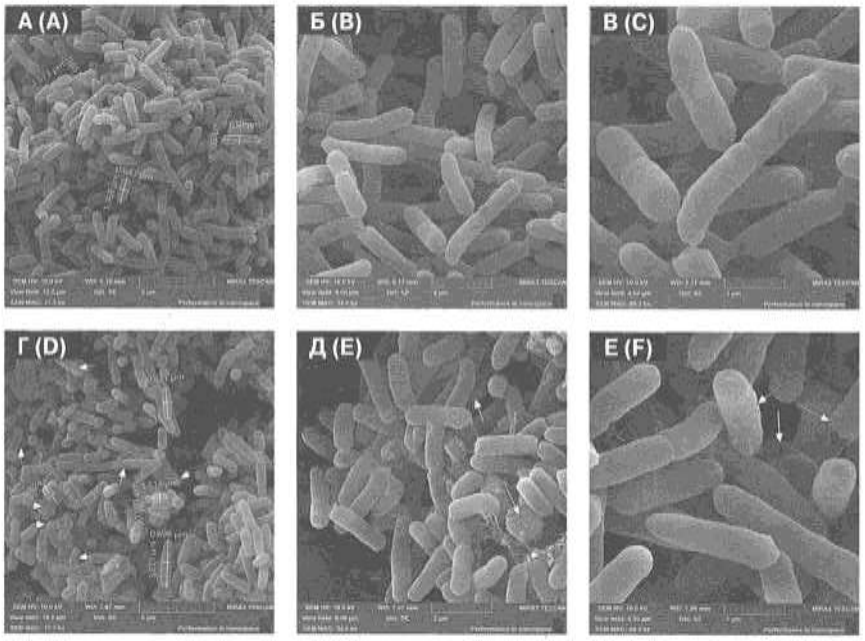


Рисунок 10. Морфоструктурные изменения *P. aeruginosa* под воздействием монохлорацетат-2,3-диметил-1Н-индол-7-аммония (Т-12)

Figure 10. Morphostructural changes in *P. aeruginosa* exposed to monochloroacetate-2,3-dimethyl-1H-indole-7-ammonium (T-12)

Примечание. А, Б, В — интактные клетки *P. aeruginosa* без обработки исследуемым соединением; Г, Д, Е — клетки *P. aeruginosa* после воздействия исследуемым соединением.

Note. A, B, C — intact *P. aeruginosa* cells without treatment with the test compound; D, E, F — *P. aeruginosa* cells after exposure to the test compound.

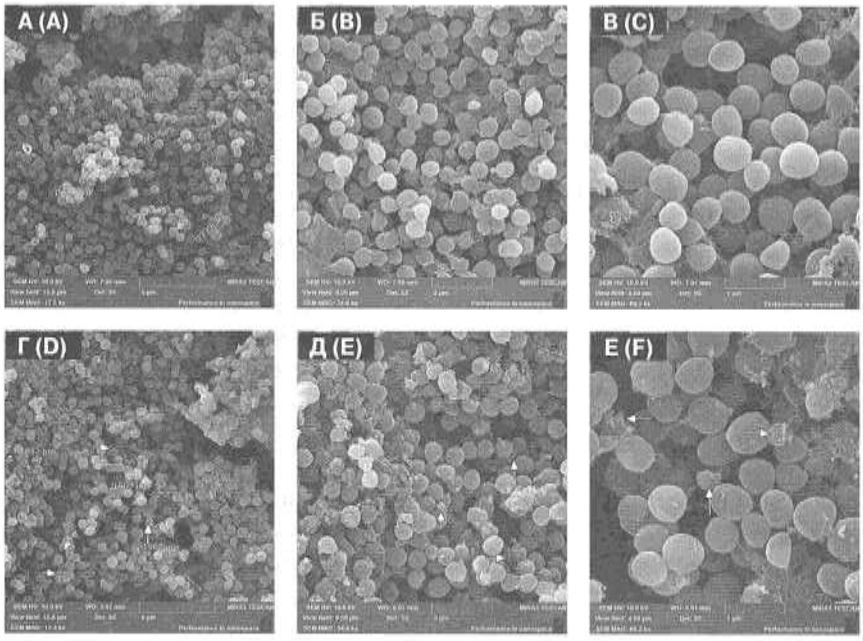


Рисунок 11. Морфоструктурные изменения *S. aureus* под воздействием монохлорацетат-2,3-диметил-1Н-индол-7-аммония (Т-12)

Figure 11. Morphostructural changes in *S. aureus* exposed to monochloroacetate-2,3-dimethyl-1H-indole-7-ammonium (T-12)

Примечание. А, Б, В — интактные клетки *S. aureus* без обработки исследуемым соединением; Г, Д, Е — клетки *S. aureus* после воздействия исследуемым соединением.

Note. A, B, C — intact *S. aureus* cells without treatment with the test compound; D, E, F — *S. aureus* cells after exposure to the test compound.

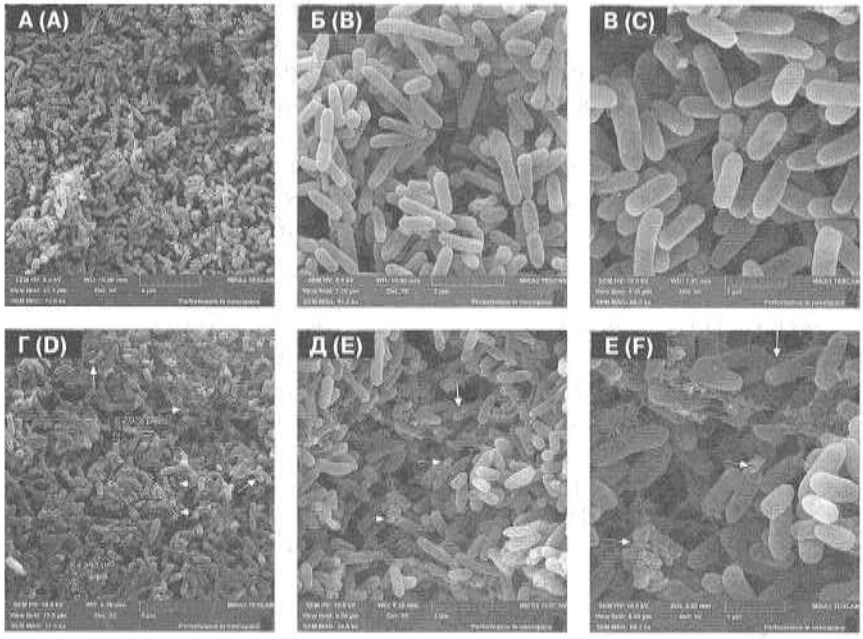


Рисунок 12. Морфоструктурные изменения *E. coli* под воздействием монохлорацетат-2,3-диметил-1Н-индол-7-аммония (Т-12)

Figure 12. Morphostructural changes in *E. coli* exposed to monochloroacetate-2,3-dimethyl-1H-indole-7-ammonium (T-12)

Примечание. А, Б, В — интактные клетки *E. coli* без обработки исследуемым соединением; Г, Д, Е — клетки *E. coli* после воздействия исследуемым соединением.

Note. A, B, C — intact *E. coli* cells without test compound treatment; D, E, F — *E. coli* cells after exposure to the test compound.

Статистический анализ морфометрии поверхности клеток в контрольных и опытных образцах не выявил существенных изменений размеров под воздействием Т7 (табл. 4).

Некоторые клетки *P. aeruginosa*, обработанные монохлорацетат-2,3-диметил-1Н-индол-7-аммонием (Т12), имеют длинную нитевидную форму и шероховатую поверхность (рис. 10Г–Д). Клеточная стенка части клеток *P. aeruginosa* отходит от клеточной мембраны (рис. 10Г–Е). Встречаются лопнувшие клетки, из полости которых вытекает внутриклеточное содержимое (рис. 10Д).

Вокруг клеток *S. aureus*, обработанных Т12, наблюдается большое количество клеточных обломков, встречаются лопнувшие клетки, наблюдается отток внутриклеточного материала из полости клеток (рис. 11Г–Е). Помимо гомогенного вещества рядом с клетками содержатся в больших количествах элементы зернистой формы.

Клетки *E. coli* после воздействия исследуемого соединения Т12 имеют отверстия, глубокие кратеры, выявляются клеточные обломки, полностью лизированные клетки. Форма и размер клеток практически не изменены (рис. 12Г–Е).

Статистический анализ морфометрии поверхности клеток в контрольных и опытных образцах не выявил существенных изменений размеров под воздействием Т12 (табл. 5).

Обсуждение

Индольные алкалоиды служат основой природных и синтетических физиологически активных веществ. Являясь частью живых систем, индол содержится в молекулах биогенного амина серотонина и незаменимой белковой аминокислоты триптофана. Исследуемые хлорсодержащие соединения индольного ряда показали свою биологическую активность, а именно — противомикробную.

Контрольные клетки были морфологически правильными и типичными (рис. 1–12, А–В) [8]. Статистический анализ морфометрии поверхности клеток в контрольных и опытных образцах не выявил существенных изменений размеров под воздействием соединений с лабораторным шифром Т1, Т4, Т7 и Т12. При этом, по сравнению с контрольными необработанными клетками *P. aeruginosa*, *S. aureus* и *E. coli*, обработка хлорзамещенными производными 5-,6-,7-аминоиндолов вызывала явные морфологические изменения, что свидетельствует об ухудшении состояния клеточной стенки.

В колониях *P. aeruginosa* под воздействием Т7 и Т12 наблюдались филаментные клетки (рис. 7Г, 10Г). Появление длинных нитей может быть связано со стрессом, который испытывает клетка после воздействия исследуемых соединений. Считается, что образование таких филаментов у бактерий в условиях стресса является результатом дефектов клеточного деления, особенно при отделении дочерних клеток [23, 40]. Есть данные, согласно которым при подавлении синтеза ДНК бактерии изменяется ее морфология, она становится длиннее, но деления клетки не происходит [37, 34]. Обработка Т1, Т7 и Т12 приводила к деградации клеточной стенки *P. aeruginosa* (рис. 1Г–Е, 7Г–Е, 10Г–Е), в то время как обработка Т4 вызывала образование пор на поверхности клетки (рис. 4Е).

В этом исследовании данные, полученные с СЭМ, показали заметные морфологические изменения клеточных стенок *S. aureus* под действием Т1, Т4, Т7 и Т12, что привело к деформации клеток (рис. 2Г–Е, 5Г–Е, 8Г–Е, 11Г–Е). Эти морфологические изменения могут быть связаны с аберрациями липидного состава мембраны, ее измененной текучестью и/или нарушениями целостности мембраны, что приводит к лизису клеточной стенки и потере внутриклеточного материала [2, 11, 15, 21].

Обработка клеток *E. coli* Т1, Т4, Т7 и Т12 при концентрации 500 мкг/мл вызывала лизис клеток, хотя нелизированные клетки также были обнаружены (рис. 3Г–Е, 6Г–Е, 9Г–Е, 12Г–Е). Появление клеточных обломков вокруг целых клеток *E. coli* указывает на повреждение мембраны, которое, вероятно, приводит к изменению осмотического давления (рис. 12Д–Е) [10, 12].

Результаты с использованием СЭМ подтвердили данные об антимикробной активности хлорзамещенных производных 5-,6-,7-аминоиндолов. Действительно, полученные морфологические изменения бактериальной поверхности указывают на мембраноповреждающую активность исследуемых соединений.

Благодарности

Работа была выполнена с использованием оборудования ЦКП «Инструментальные методы в экологии» при ИПЭЭ РАН.

Список литературы/References

1. Агарев А.Е. Распространенность ESKAPE-патогенов в отделении реанимации и интенсивной терапии новорожденных // Социально-гигиенический мониторинг здоровья населения: материалы к 24-й Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием. Вып. 24. Под ред. В.А. Кирюшина. Рязань, 2020. С. 148–152. [Agarev A.E. Prevalence of ESKAPE-pathogens in neonatal intensive care units // Social and Hygienic Monitoring of Population Health: Proceedings for the 24th All-Russian Scientific and Practical Conference with International Participation. Iss. 24. Ed. by V.A. Kiryushin. *Ryazan, 2020, pp. 148–152. (In Russ.)*]

2. Андреевская С.Г., Шевлягина Н.В., Псеунова Д.Р. Изменения морфологии S. aureus в условиях их культивирования в присутствии антибактериальных препаратов // Медицина. 2020. Т. 8, № 2. С. 31–49. [Andreevskaya S.G., Shevlyagina N.V., Pseunova J.R. Morphological changes of S. aureus cultivated in the presence of antibacterial drugs. *Meditsina = Medicine, 2020, vol. 8, no. 2, pp. 31–49. (In Russ.)] doi: 10.29234/2308-9113-2020-8-2-31-49*
3. Методики клинических лабораторных исследований: справочное пособие. Том 3. Клиническая микробиология: бактериологические исследования; микологические исследования; паразитологические исследования; инфекционная иммунодиагностика; молекулярная диагностика инфекционных заболеваний / Под ред. В.В. Меньшикова. М.: Лабора, 2009. 880 с. [Methods of clinical laboratory tests: a reference manual. Vol. 3. Clinical microbiology: bacteriological studies; mycological studies; parasitological studies; infectious immunodiagnostics; molecular diagnosis of infectious diseases. Ed. by V.V. Menshikov. *Moscow: Labora, 2009. 880 p. (In Russ.)*]
4. Мороз А.Ф., Анциферова Н.Г., Баскакова Н.В. Синегнойная инфекция. М.: Медицина, 1988. 256 с. [Moroz A.F., Antsiferova N.G., Baskakova N.V. Pseudomonas infection. *Moscow: Meditsina, 1988. 256 p. (In Russ.)*]
5. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений: приказ МЗ СССР № 535 от 22.04.1985 г. М., 1985. 93 с. [Unification of microbiological (bacteriological) methods of investigation used in clinical diagnostic laboratories of medical and preventive institutions: Order of the Ministry of Health of the USSR No. 535. April 22, 1985. Moscow, 1985. 93 p. (In Russ.)]
6. Патент № 2724605 Российская Федерация. МПК C07D 209/40 (2006.01), СПК C07D 209/40 (2020.02). Способ получения монохлорацетатов замещенных 5-,6-,7-аминоиндолов, обладающих противомикробным действием; № 2019125333, заявлено 2019.08.09, опубликовано 2020.06.25 / Степаненко И.С., Ямашкин С.А., Батаршева А.А., Сластников Е.Д. Патентообладатель: МГУ им. Н.П. Огарева. 9 с. [Patent No 2724605 Russian Federation, Int.Cl. C07D 209/40 (2006.01), C07D 209/40 (2020.02). Method of producing monochloroacetates of substituted 5-, 6-, 7-aminoindoles, having antimicrobial action; № 2019125333, application 2019.08.09; date of publication 2020.06.25 / Stepanenko I.S., Yamashkin S.A., Batarsheva A.A., Slastnikov E.D. Proprietors National Research Mordovia State University. 9 p.]
7. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. 944 с. [Guidelines for conducting preclinical studies of medicines. Part one. *Moscow: Grif i K, 2012. 944 p. (In Russ.)*]
8. Сазыкин Ю.О., Навашин П.С. Антибиотики и оболочка бактериальной клетки. Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. М.: ВИНИТИ, 1991. Т. 31. 182 с. [Sazykin Yu.O., Navashin P.S. Antibiotics and bacterial cell envelope. Science and Technology Outcomes. Biotechnology Series. *Mocsow: VINITI, 1991, vol. 31, 182 p. (In Russ.)*]
9. Супотницкий М.В. Механизмы развития резистентности к антибиотикам у бактерий // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2011. Т. 42, № 2. С. 4–13. [Supotnitskiy M.V. Mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnostics, Treatment, 2011, vol. 42, no. 2, pp. 4–13. (In Russ.)*]
10. Armas F., Pacor S., Ferrari E., Guida F., Pertinhez T.A., Romani A.A., Scocchi M., Benincasa M. Design, antimicrobial activity and mechanism of action of Arg-rich ultra-short cationic lipopeptides. *PLoS One, 2019, vol. 14, no. 2: e0212447. doi: 10.1371/journal.pone.0212447*
11. Bajpai V.K., Shukla S., Paek W.K., Lim J., Kumar P., Kumar P., Na M. Efficacy of (+)-Lariciresinol to control bacterial growth of Staphylococcus aureus and Escherichia coli O157:H7. *Front. Microbiol., 2017, vol. 8: 804. doi: 10.3389/fmicb.2017.00804*
12. Barreto-Santamaría A., Curtidor H., Arévalo-Pinzón G., Herrera C., Suárez D., Pérez W.H., Patarroyo M.E. A New Synthetic Peptide Having Two Target of Antibacterial Action in E. coli ML35. *Front. Microbiol., 2016, vol. 7: 2006. doi: 10.3389/fmicb.2016.02006*
13. Ciofu O., Hansen C.R., Høiby N. Respiratory bacterial infections in cystic fibrosis. *Curr. Opin. Pulm. Med., 2013, vol. 19, no. 3, pp. 251–8. doi: 10.1097/MCP.0b013e32835f1afc*
14. Classics in infectious diseases. «On abscesses». Alexander Ogston (1844–1929). *Rev. Infect. Dis., 1984, vol. 6, no. 1, pp. 122–128. doi: 10.1093/clinids/6.1.122*
15. Cui H., Zhang X., Zhou H., Zhao C., Lin L. Antimicrobial activity and mechanisms of Salvia sclarea essential oil. *Bot. Stud., 2015, vol. 56, no. 1: 16. doi: 10.1186/s40529-015-0096-4*
16. Defez C., Fabbro-Peray P., Bouziges N., Gouby A., Mahamat A., Daurès J.P., Sotto A. Risk factors for multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa nosocomial infection. *J. Hosp. Infect., 2004, vol. 57, no. 3, pp. 209–216. doi: 10.1016/j.jhin.2004.03.022*
17. Diggle S.P., Whiteley M. Microbe Profile: Pseudomonas aeruginosa: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology (Reading), 2020, vol. 166, no. 1, pp. 30–33. doi: 10.1099/mic.0.000860*
18. Dosunmu E.F., Chaudhari A.A., Bawage S., Bakeer M.K., Owen D.R., Singh S.R., Dennis V.A., Pillai S.R. Novel cationic peptide TP359 down-regulates the expression of outer membrane biogenesis genes in Pseudomonas aeruginosa: a potential TP359 anti-microbial mechanism. *BMC Microbiol., 2016, vol. 16, no. 1: 192. doi: 10.1186/s12866-016-0808-2*
19. Dosunmu E., Chaudhari A.A., Singh S.R., Dennis V.A., Pillai S.R. Silver-coated carbon nanotubes downregulate the expression of Pseudomonas aeruginosa virulence genes: a potential mechanism for their antimicrobial effect. *Int. J. Nanomedicine, 2015, vol. 10, pp. 5025–5034. doi: 10.2147/IJN.S85219*
20. Eckert R., Brady K.M., Greenberg E.P., Qi F., Yarbrough D.K., He J., McHardy I., Anderson M.H., Shi W. Enhancement of antimicrobial activity against pseudomonas aeruginosa by coadministration of G10KHc and tobramycin. *Antimicrob. Agents Chemother., 2006, vol. 50, no. 11, pp. 3833–3838. doi: 10.1128/AAC.00509-06*
21. Greenwood D., O'Grady F. Scanning electron microscopy of Staphyloccus aureus exposed to some common anti-staphylococcal agents. *J. Gen. Microbiol., 1972, vol. 70, no. 2, pp. 263–270. doi: 10.1099/00221287-70-2-263*
22. Hartmann M., Berditsch M., Hawecker J., Ardakani M.F., Gerthsen D., Ulrich A.S. Damage of the bacterial cell envelope by antimicrobial peptides gramicidin S and PGLa as revealed by transmission and scanning electron microscopy. *Antimicrob. Agents Chemother., 2010, vol. 54, no. 8, pp. 3132–3142. doi: 10.1128/AAC.00124-10*
23. Jones T.H., Vail K.M., McMullen L.M. Filament formation by foodborne bacteria under sublethal stress. *Int. J. Food Microbiol., 2013, vol. 165, no. 2, pp. 97–110. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.001*

24. Kolle W., Hetsch H. Die experimentelle Bakteriologie und die Infektionskrankheiten mit besonderer Berücksichtigung der Immunitätslehre. Ein Lehrbuch für Studierende Ärzte und Medizinalbeamte. *Urban & Schwarzenberg, Berlin 1906.*
25. Kong C., Chee C.F., Richter K., Thomas N., Abd Rahman N., Nathan S. Suppression of Staphylococcus aureus biofilm formation and virulence by a benzimidazole derivative, UM-C162. *Sci. Rep., 2018, vol. 8, no. 1: 2758. doi: 10.1038/s41598-018-21141-2*
26. Leimbach A., Hacker J., Dobrindt U. E. coli as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol., 2013, vol. 358, pp. 3–32. doi: 10.1007/82_2012_303*
27. Mahgoub S.A., Osman A.O., Sitohy M.Z. Bioactive proteins against pathogenic and spoilage bacteria. *Functional Foods in Health and Disease, 2014, vol. 4, no. 10, pp. 451–462. doi: 10.31989/ffhd.v4i10.155*
28. Marcellini L., Giammatteo M., Aimola P., Mangoni M.L. Fluorescence and electron microscopy methods for exploring antimicrobial peptides mode(s) of action. *Methods Mol. Biol., 2010, vol. 618, pp. 249–266. doi: 10.1007/978-1-60761-594-1_16*
29. Migula W. System der Bakterien: Handbuch der Morphologie, Entwicklungsgeschichte und Systematik der Bakterien. *Fischer, 1900. 410 p.*
30. Mwangi J., Yin Y., Wang G., Yang M., Li Y., Zhang Z., Lai R. The antimicrobial peptide ZY4 combats multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2019, vol. 116, no. 52, pp. 26516–26522. doi: 10.1073/pnas.1909585117*
31. Schroeter J. Ueber einige durch Bacterien gebildete Pigmente. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen, 1872, vol. 1, no. 2, pp. 109–126.*
32. Sun H.Y., Fujitani S., Quintiliani R., Yu V.L. Pneumonia due to Pseudomonas aeruginosa: part II: antimicrobial resistance, pharmacodynamic concepts, and antibiotic therapy. *Chest, 2011, vol. 139, no. 5, pp. 1172–1185. doi: 10.1378/chest.10-0167*
33. Rosenbach A.J.F. Mikro-organismen bei den Wund-infections-krankheiten des Menschen. *Wiesbaden: JF Bergmann, 1884. 122 p.*
34. Rosenberger C.M., Gallo R.L., Finlay B.B. Interplay between antibacterial effectors: a macrophage antimicrobial peptide impairs intracellular Salmonella replication. *Proc. Natl Acad. Sci. USA, 2004, vol. 101, no. 8, pp. 2422–2427. doi: 10.1073/pnas.0304455101*
35. Shulman S.T., Friedmann H.C., Sims R.H. Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician? *Clin. Infect. Dis., 2007, vol. 45, no. 8, pp. 1025–1029. doi: 10.1086/521946*
36. Silhavy T.J., Kahne D., Walker S. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb. Perspect Biol., 2010, vol. 2, no. 5: a000414. doi: 10.1101/cshperspect.a000414*
37. Subbalakshmi C., Sitaram N. Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. *FEMS Microbiol. Lett., 1998, vol. 160, no. 1, pp. 91–96. doi: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb12896.x*
38. Wu Y., Liang J., Rensing K., Chou T.M., Libera M. Extracellular matrix reorganization during cryo preparation for scanning electron microscope imaging of Staphylococcus aureus biofilms. *Microsc. Microanal., 2014, vol. 20, no. 5, pp. 1348–1355. doi: 10.1017/S143192761401277X*
39. Xu Z.G., Gao Y., He J.G., Xu W.F., Jiang M., Jin H.S. Effects of azithromycin on Pseudomonas aeruginosa isolates from catheter-associated urinary tract infection. *Exp. Ther. Med., 2015, vol. 9, no. 2, pp. 569–572. doi: 10.3892/etm.2014.2120*
40. Yamaki S., Kawai Y., Yamazaki K. Long filamentous state of Listeria monocytogenes induced by sublethal sodium chloride stress poses risk of rapid increase in colony-forming units. *Food Control, 2021, vol. 124: 107860. doi: 10.1016/j.foodcont.2020.107860*

Авторы:
Масейкина А.А., соискатель кафедры иммунологии, микробиологии и вирусологии Медицинского института ФГБОУ ВО Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, г. Саранск, Россия;
Степаненко И.С., д.м.н., доцент, зав. кафедрой иммунологии, микробиологии и вирусологии с курсом клинической микробиологии ФГБОУ ВО Волгоградский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Волгоград, Россия;
Платкова Т.Н., соискатель кафедры иммунологии, микробиологии и вирусологии Медицинского института ФГБОУ ВО Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, г. Саранск, Россия;
Кирютина А.И., соискатель кафедры иммунологии, микробиологии и вирусологии Медицинского института ФГБОУ ВО Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, г. Саранск, Россия;
Малышева В.С., студентка Медицинского института ФГБОУ ВО Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, г. Саранск, Россия

Authors:
Maseykina A.A., PhD Student, Department of Immunology, Microbiology and Virology, Medical Institute, National Research Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russian Federation;
Stepanenko I.S., DSc (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Immunology, Microbiology and Virology, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation;
Platkova T.N., PhD Student, Department of Immunology, Microbiology and Virology, Medical Institute, National Research Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russian Federation;
Kiryutina A.I., PhD Student, Department of Immunology, Microbiology and Virology, Medical Institute, National Research Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russian Federation;
Malysheva V.S., Student of the Medical Institute, National Research Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russian Federation

Поступила в редакцию 25.11.2022
Принята к печати 09.03.2023

Received 25.11.2022
Accepted 09.03.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 2, pp. 257–274
Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 2, с. 257–274

ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ НОВООБРАЗОВАНИЯ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА КАК СЛЕДСТВИЕ КРОВЕПАРАЗИТАРНОЙ (ГЕМОСПОРИДИЙНОЙ) ИНФЕКЦИИ

А.В. Терлецкий, Л.Г. Ахмерова

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск, Россия

Резюме. Исследования архивного цитологического материала, полученного врачами-цитологами в ходе выполнения тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии при фолликулярном, папиллярном и медуллярном раках щитовидной железы человека, позволили выявить во всех пробах гемоспоридийную (кровепаразитарную) инфекцию в тироцитах (шизогония), эритроцитах и в виде экзоэритроцитарной стадии развития (микрошизонт). Цитологический материал в условиях медицинских лабораторий был окрашен по Романовскому–Гимзе. Для уточнения локализации ядер (ДНК) тироцитов и гемоспоридий было решено окрасить (перекрасить) оригинальные мазки реактивом Шиффа по Фельгену, где краситель фуксин после гидролиза ДНК соляной кислотой встраивается в ДНК и окрашивает ее в красно-фиолетовый цвет. Специально неокрашенная протоплазма гемоспоридий выявлялась в виде светлой полосы вокруг ядер в эритроцитах. При фолликулярном раке щитовидной железы окрашивание по Фельгену позволило локализовать ядра тироцитов (ДНК) и паразитарную ДНК в виде точечных включений, кольцевых форм и диффузно распределенную в цитоплазме тироцита. Цитоплазма и ядра тироцитов вакуолизированы. Ядра тироцитов деформированы, уплощены и смещены к периферии клетки. Эритроциты содержали ядра (ДНК) гемоспоридий. При папиллярном раке щитовидной железы удалось локализовать ядерную ДНК тироцитов и паразитарную ДНК в виде точечных включений, а также диффузно распределенную в цитоплазме тироцитов. В гиперплазированной цитоплазме могут располагаться эксцентрично два и более полиморфные ядра. Микрошизонты гемоспоридий выявлены в тироцитах приядерно, а также в виде экзоэритроцитарной стадии в крови. При медуллярном раке щитовидной железы в гиперплазированной цитоплазме тироцитов удалось локализовать эксцентрично расположенные ядра (ДНК) тироцитов и мелкие ядра (ДНК) гемоспоридий, которые могли заполнять все пространство тироцита. Выявлены тироциты с вакуолизированной цитоплазмой и выраженым полиморфизмом ядер. Размеры гиперплазированных ядер в несколько раз превышали размеры ядер нормальных тироцитов. Вакуоли цитоплазмы и ядер тироцитов окрашивались светлее, чем окружающие ткани (красно-фиолетовым цветом), что, по всей вероятности, свидетельствует о наличии в них паразитарной ДНК. ДНК гемоспоридий в эритроцитах крови при папиллярном и медуллярном раках представлена полиморфными ядрами, что может свидетельствовать об одновременном присутствии

Адрес для переписки:
Терлецкий Александр Витальевич
630090, Россия, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 8/2,
Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН.
Тел.: 8 (383) 363-90-42 (служебн.); 8 952 905-03-28,
8 913 717-99-42 (моб.).
Факс: 8 (383) 363-90-78.
E-mail: terletsky@mcb.nsc.ru; terletsky_1@mail.ru

Contacts:
Alexander V. Terletsky
630090, Russian Federation, Novosibirsk, Acad. Lavrentieva pr., 8/2,
Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS.
Phone: +7 (383) 363-90-42 (служебн.); +7 952 905-03-28,
+7 913 717-99-42 (моб.).
Fax: +7 (383) 363-90-78.
E-mail: terletsky@mcb.nsc.ru; terletsky_1@mail.ru

Для цитирования:
Терлецкий А.В., Ахмерова Л.Г. Злокачественные новообразования щитовидной железы человека как следствие кровепаразитарной (гемоспоридийной) инфекции // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 2. С. 257–274. doi: 10.15789/2220-7619-МНТ-1948

Citation:
Terletsky A.V., Akhmerova L.G. Malignant human thyroid neoplasms associated with blood parasitic (haemosporidian) infection // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 2, pp. 257–274. doi: 10.15789/2220-7619-МНТ-1948

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных научных исследований по теме FWGZ-2022-0014 (регистрационный номер 122011400181-7).
This work was supported by the basic science research program FWGZ-2022-0014 (registration number 122011400181-7).

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-МНТ-1948

в крови разных видов и/или генераций возбудителя. Появляются многоядерные тироциты с незавершенным цитокинезом. Внутриклеточное паразитирование гемоспоридийной инфекции в тироцитах (шизогония) при трех видах рака щитовидной железы приводит к выраженной гиперплазии цитоплазмы, вакуолизации ее и ядра тироцита. Происходит деформация ядер с уменьшением их в размере, уплощением и смещением на периферию клетки, с высокой вероятностью возникновения мутаций и делеций ДНК пораженных клеток, достигающих неопластического уровня.

Ключевые слова: *щитовидная железа, фолликулярный рак, папиллярный рак, медуллярный рак, цитологическое исследование, кровепаразитарная (гемоспоридийная) инфекция.*

MALIGNANT HUMAN THYROID NEOPLASMS ASSOCIATED WITH BLOOD PARASITIC (HAEMOSPORIDIAN) INFECTION

Terletsky A.V., Akhmerova L.G.

Institute of Molecular and Cellular Biology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. A retrospective investigation of archival cytology specimens obtained and verified by a fine-needle aspiration biopsy from patients with follicular, papillary, and medullary human thyroid cancers revealed haemosporidian (blood parasitic) infection in thyrocytes (schizogony) and erythrocytes. The exoerythrocytic stage of infection is represented by finding microschizonts. Cytologic material was stained with Romanowsky–Giemsa dye in medical laboratories. Original specimens were stained (re-stained) with Schiff reagent according to the Feulgen method to clarify location of thyrocyte DNA and hemosporidian pathogens, wherein fuchsine was incorporated into DNA molecules after they were hydrolyzed by hydrochloric acid to stain specimens into red-violet color. An intentionally unstained hemosporidian protoplasm during blood parasitic infection was observed as a light band around erythrocyte nuclei. In follicular thyroid cancer, thyrocyte Feulgen staining revealed nuclear DNA and parasitic DNA (haemosporidium nuclei) as punctate inclusions and rings diffusely distributed in the thyrocyte cytoplasm. The thyrocyte cytoplasm and nuclei were vacuolated, with thyrocyte nuclei being deformed, flattened, and displaced to the cell periphery. The erythrocytes contained haemosporidian nuclei (DNA). In papillary thyroid cancer, we were able to localize the nuclear DNA of thyrocytes and the parasitic DNA as punctate inclusions diffusely distributed in the thyrocyte cytoplasm. Two or more polymorphic nuclei may be positioned eccentrically in the hyperplastic cytoplasm. Haemosporidian microschizonts were found circumnuclearly in thyrocytes as well as an exoerythrocytic stage in the blood. In medullary thyroid cancer, the hyperplastic cytoplasm of thyrocytes contained eccentrically located nuclei (DNA) of thyrocytes and small haemosporidian nuclei (DNA), which may occupy the whole thyrocyte. There were thyrocytes with vacuolated cytoplasm and prominent nuclear polymorphism. The size of hyperplastic nuclei was several times larger than that of normal thyrocyte nuclei. The color of stained thyrocyte cytoplasmic and nuclear vacuoles was less red-violet compared with that of surrounding tissues, which potentially indicates the presence of parasitic DNA inside them. The intra-erythrocyte nuclear haemosporidian material of varying sizes in papillary and medullary cancers may evidence about various species and/or pathogen generation. Intracellular parasitism of haemosporidian infection in thyrocytes (schizogony) associated with three thyroid cancer types leads to marked thyrocyte cytoplasmic hyperplasia, cytoplasmic vacuolization, and nuclear vacuolization. Multinucleated thyrocytes with incomplete cytokinesis emerge. Nuclear deformation occurs, which leads to decreased nucleus size, flattening and displacement to the cell periphery, with high risk of DNA mutations and deletions in affected cells, reaching a neoplastic level.

Key words: *thyroid, follicular cancer, papillary cancer, medullary cancer, cytological examination, hemosporidian infection*

Введение

В научных публикациях по доброкачественным и злокачественным опухолям щитовидной железы (ЩЖ) человека имеется подробное морфологическое и цитогистологическое описание структуры и характеристик опухолей, разные предположения о причинах их развития, однако до сих пор этиология остается невыясненной [22].

При исследовании документированного врачами-цитологами архивного цитологического материала, полученного после тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии (ТАПБ), настораживающим моментом для нас стала информация об одновременном присутствии в долях ЩЖ аутоиммунного тиреоидита, кистозного образования, узлового зоба, а также фолликулярного, папиллярного и медуллярного раков (ФР, ПР и МР) в разных сочетаниях. Невольно возник вопрос об их возможной этиологической взаимосвязи [18]. Ранее Автандилов Г.Г. (1984), Юшков П.В. с соавт. (2003) [цит. по 22], а также [43, 68, 103, 119, 124] предполагали, что фолликулярная аденома и ФР являются последовательными

стадиями одного патологического процесса. Молекулярными методами исследования показано, что это одни и те же опухоли, но на разных стадиях патологического процесса [64].

Результатами наших исследований [18] установлено, что причиной воспалительных и доброкачественных образований ЩЖ могут быть гемоспоридийные инфекции крови. В современной классификации положение их возбудителей таково: царство *Eukaryota*, класс *Alveolata*, филум *Apicomplexa*, подкласс *Aconoidasida*, отряд *Piroplasmida*, сем. *Babesiidae* и сем. *Theileria*. (http://lifemap.univ-lyon1.fr/explore.html).

Babesia spp. (*B.* spp.) и *Theileria* spp. (*Th.* spp.) — беспигментные патогенные эукариотические простейшие, паразитирующие в крови и ретикулоэндотелиальной системе (системе мононуклеарных фагоцитов) теплокровных животных и человека. При световой микроскопии внутриэритроцитарные стадии *B.* spp. неразличимы от *Th.* spp. [102]. Основным отличием указанных возбудителей служит первичное развитие либо в эритроцитах (бабезии), либо в клетках лимфоидной ткани в лимфоузлах (тейлерии). В зависимости от этого принадлежность возбудителей к сем. *Babesiidae* или сем. *Theileria* постоянно пересматривается [31]. Клетками-мишенями для них являются эритроциты, эндотелий сосудов, лейкоциты, клетки паренхиматозных органов и нервной ткани [4, 18, 19, 76, 88, 100, 112].

При бабезиозе (пироплазмозе) характерным признаком является первичное развитие паразита (спорозоита) после попадания в организм хозяина в эндотелии сосудов, где происходит шизогония, с последующим инфицированием мерозоитами эритроцитов. Наряду с эритроцитарными стадиями, у бабезий найдены стадии, локализующиеся внеклеточно, свободно, в плазме крови. Наибольшее число этих стадий встречается в мелких кровеносных сосудах легких, почек, сердечной мышцы, спинного мозга, печени и селезенки. Наибольшее количество их встречается в органах, богатых кислородом [5]. После эритроцитарной стадии развития происходит инфицирование лимфоидной ткани с гиперплазией лимфоузлов.

Цикл развития тейлерий, отличается от цикла развития бабезий стадией преэритроцитарной шизогонии во внутренних органах, богатых лимфатическими клетками и клетками ретикулоэндотелия, что приводит к инфицированию и выключению первичного механизма защиты — ретикулоэндотелиальной системы. Образовавшиеся здесь гаметоциты после шизогонии попадают в кровяное русло и внедряются в эритроциты [5, 8]. При развитии тейлерий в лимфоидной ткани (лимфоузлах) образуются макро- и микрошизонты («коховские шары» или «гранатные тела»), которые можно увидеть только при пункции лимфоузлов [15, 107, 108]. Считалось, что отличительным признаком тейлериоза является расположение делящегося трофозоита в эритроцитах крови в виде «мальтийского креста», однако, при паразитировании некоторых видов бабезий отмечают такое же расположение трофозоитов в эритроцитах [15].

Эндоглобулярные включения в эритроцитах крови, попадающие в мазки при ТАПБ ЩЖ при разных видах карцином, врачи-цитологи воспринимали как нарушение технологии приготовления и окрашивания мазков.

Доброкачественные и злокачественные опухоли ЩЖ, по нашему мнению, — это взаимосвязанное поэтапное клиническое проявление хронической формы гемоспоридийной инфекции с вовлечением в патологический процесс последовательно всех клеточных структур ЩЖ.

Предопухолевые изменения, как правило, развиваются по следующему принципу: диффузной гиперплазии, очаговой гиперплазии с образованием очагов пролиферации, доброкачественных опухолей и злокачественных опухолей. При этом стадии очаговых пролифератов и доброкачественных опухолей могут сливаться между собой, а злокачественные опухоли чаще всего развиваются из очаговых пролифератов [20].

Таким образом, ФР — первая стадия формирования злокачественной опухоли из неопластически трансформированных тироцитов доброкачественной опухоли вследствие внутриклеточного паразитирования в них гемоспоридийной инфекции (шизогония). ФР встречается сравнительно редко — в 15% всех злокачественных опухолей ЩЖ. Наиболее характерным признаком при цитологической диагностике является увеличение ядер в размерах, наличие крупно-зернистого хроматина, незначительного ядерного полиморфизма, увеличение числа и размеров ядрышек [1]. В большинстве случаев ядра округлые, полиморфизм и атипия ядер не выражены, ядра располагаются тесно, хроматин в ядрах преимущественно мелкозернистый, относительно равномерный, ядрышки чаще одиночные мономорфные с преимущественно эксцентрическим расположением в ядре [10]. Известно, что ФР крайне редко метастазирует в лимфоузлы, в головной мозг, печень и кожу [103], однако гематогенные метастазы выявляют в легких, костях и кровеносных сосудах, отмечают инкапсулирование, инвазивный рост в капсулу и сосуды [22].

ПР — вторая стадия развития гемоспоридий в опухоли ЩЖ и одна из самых частых (60–80%) злокачественных опухолей ЩЖ. Ядра тироцитов округлой и овальной формы с характерной бороздкой по длиннику, в 80% случаев отмечают внутриядерные включения цитоплазмы, напоминающие вакуоль при жировой дистрофии

клеток с наличием резкого уплотнения хроматина вокруг нее в виде гиперхромного пояса [1]. При ПР отмечается лимфоаденопатия, метастазирование в региональные лимфоузлы. Реже гематогенное метастазирование в легкие и спинной мозг. Отмечают фиброз, склероз стромы, образование кальцинатов [22].

МР — третья стадия развития гемоспоридий в опухоли с более глубоким проникновением инфекции в ЩЖ. При этой опухоли отмечают образование кальцинатов, отложение белка амилоида и, в редких случаях, меланина. Выявляют многоядерные и гигантские клетки и патологические митозы [22].

По нашему предположению, с учетом предыдущего исследования [18], появление внутриклеточной базофильной зернистости в тироцитах при разных видах карцином ЩЖ есть следствие шизогональной стадии развития гемоспоридийной инфекции крови. Данная информация послужила основанием провести ретроспективное сравнительное микроскопическое исследование цитологического материала после ТАПБ с конкретными клиническими диагнозами (ФР, ПР и МР) с целью выяснения возможной причины этих заболеваний.

Материалы и методы

В данном цитологическом исследовании мазков ТАПБ ЩЖ использован документированный врачами-цитологами архивный материал 60 пациентов с клиническими диагнозами ФР, ПР и МР за 2007–2014 г. (по 20 человек с каждым видом рака).

Весь цитологический материал, подлежащий исследованию, изначально в условиях медицинских лабораторий был окрашен по Романовскому–Гимзе. Метод окрашивания мазков по Романовскому–Гимзе является адсорбционным, что позволяет повторно использовать эти же мазки для окрашивания (перекрашивания) реактивом Шиффа по Фельгену для уточнения локализации ДНК гемоспоридий в тироцитах и клетках крови. Реактив Шиффа (фуксинсернистая кислота) является качественным реактивом на альдегиды. На свойстве реактива Шиффа взаимодействовать с альдегидными группами основана реакция Фельгена. В молекуле ДНК альдегидные группы связаны, их необходимо предварительно освободить. При слабом кислотном гидролизе нуклеиновых кислот (вследствие отщепления пуринов и пиримидинов от дезоксирибозофосфата) появляются свободные альдегидные группы, образующие ярко окрашенный комплекс при взаимодействии с фуксином (реакция Фельгена). Реактив Шиффа окрашивает только ядра и хромосомы в красновато-фиолетовый цвет, цитоплазма остается совершенно неокрашенной. Реакция Фельгена указывает на присутствие ДНК, она может быть использована для констатации наличия или отсутствия ядер в клетках, определения их размеров, формы, местоположения, а интенсивность окрашивания может дать косвенное представление о количественных изменениях ДНК.

В процессе гидролиза ДНК в течении 8 мин в 1 н растворе соляной кислоты при температуре 60°С в мазках, окрашенных по Романовскому–Гимзе, основной краситель (метиленовая синь) сходил с мазков в раствор соляной кислоты, окрашивая его в синий цвет. Мазки промывали в дистиллированной воде, быстро ополаскивали в холодном 1 н растворе соляной кислоты и переносили в реактив Шиффа на 16 ч при температуре от 0 до 4°С (время экспозиции выбрано опытным путем). Не споласкивая, мазки последовательно помещали в три порции сернистой воды на 2 мин в каждую. Препараты промывали в дистиллированной воде по 10 мин и сушили на воздухе.

Такое перекрашивание оригинальных архивных мазков позволяет точно идентифицировать место ядерной ДНК тироцитов и ДНК возможных внутриклеточных инфекций в цитоплазме тироцитов и в эритроцитах крови. Эритроциты, первоначально окрашенные эозином, сохраняют свой цвет без изменений. Протоплазму гемоспоридий, определяемую в виде светлой полосы вокруг ядер, специально не окрашивали для контрастного восприятия ДНК в тироцитах и эритроцитах.

При рутинном цитологическом исследовании мазков после ТАПБ особое внимание обращают на структурные изменения в тироцитах и клеточном составе ткани ЩЖ, что является основным в интерпретации и постановке диагноза.

Исследования цитологических мазков проводили на микроскопе Axiostar plus (Carl Zeiss). Внимательно исследовали внутриклеточные структуры в тироцитах и клетках крови при увеличении микроскопа в 1000 раз с иммерсией (Окуляр PL 10×/18∞, объектив CP-ACHROMAT 100×/1.25 oil, ∞/0.17). Фотографии делали камерой Olympus SP-310.

Результаты

В цитологическом материале ТАПБ, окрашенном по Романовскому–Гимзе, были выявлены:

1. При ФР (рис. 1–2) — тироциты с мелкими и крупными внутриклеточными базофильными включениями от 0,5 мкм до 3 мкм, заполняющими всю гиперплазированную цитоплазму. В мазках встречаются тироциты с вакуолизированными ядром и цитоплазмой, в которых могут

Иллюстрации к статье «Злокачественные новообразования щитовидной железы человека как следствие кровепаразитарной (гемоспоридийной) инфекции» (авторы: А.В. Терлецкий, Л.Г. Ахмерова) (с. 257–274) (1-й фрагмент; продолжение см. на с. II)

Illustrations for the article "Malignant human thyroid neoplasms associated with blood parasitic (haemosporidian) infection" (authors: Terletsky A.V., Akhmerova L.G.) (pp. 257–274) (1st fragment; continued on p. II)

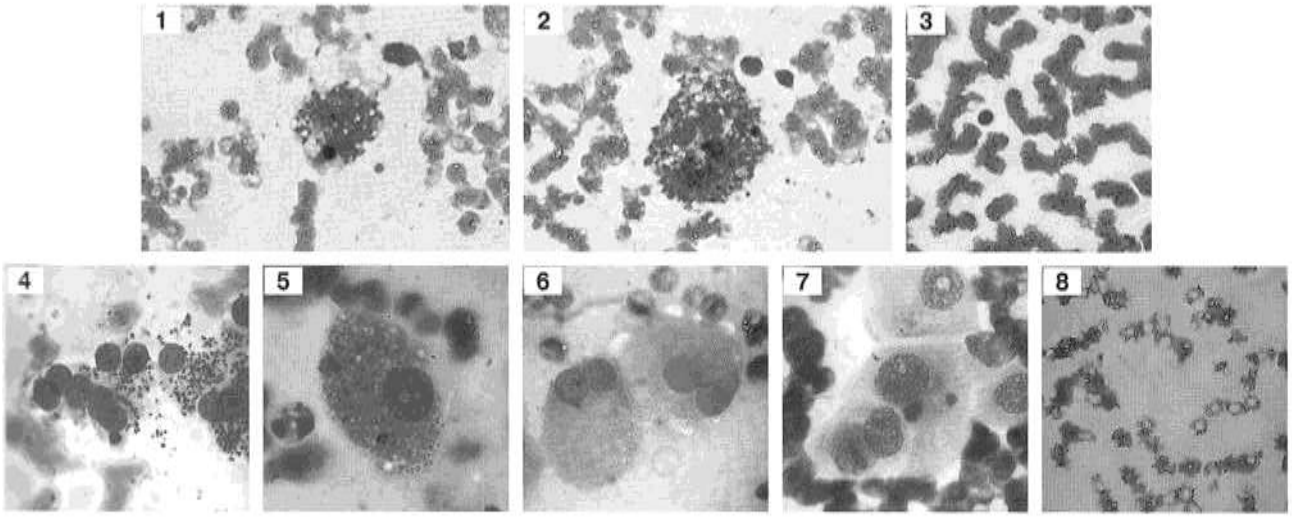


Рисунок 1. Фолликулярный рак. Цитоплазма тироцита заполнена базофильными включениями с участком повышенной оптической плотности, прилегающим к ядру (шизогония). Вакуоли в цитоплазме и ядре. В эритроцитах находятся эндоглобулярные включения. Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 1. Follicular cancer. The thyrocyte cytoplasm is filled with basophilic inclusions with an area of increased optical density adjacent to the nucleus (schizogony). Vacuoles in the cytoplasm and nucleus. RBCs contain endoglobular inclusions. Romanovsky–Giemsa staining

Рисунок 2. Фолликулярный рак. Двуядерный тироцит с базофильными включениями в цитоплазме и ядрах, с двумя участками повышенной оптической плотности (шизогония), вакуоли в цитоплазме. В эритроцитах находятся эндоглобулярные включения. Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 2. Follicular cancer. Binuclear thyrocyte with basophilic inclusions in the cytoplasm and nuclei, with two areas of increased optical density (schizogony), vacuoles in the cytoplasm. RBCs contain endoglobular inclusions. Romanovsky–Giemsa staining

Рисунок 3. Фолликулярный рак. Цитоадгезированные эритроциты с эндоглобулярными включениями. Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 3. Follicular cancer. Cytoadhesive erythrocytes with endoglobular inclusions. Romanovsky–Giemsa staining

Рисунок 4. Папиллярный рак. Цитоплазма тироцитов заполнена базофильными включениями с участком повышенной оптической плотности около 5 мкм, расположенным около ядра тироцита (шизогония). Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 4. Papillary cancer. The cytoplasm of thyrocytes is filled with basophilic inclusions with an area of increased optical density of about 5 μm, located near the thyrocyte nucleus (schizogony). Romanovsky–Giemsa staining

Рисунок 5. Папиллярный рак. Базофильная зернистость находится в цитоплазме тироцита и ядре. Эндоглобулярные включения такой же оптической плотности присутствуют в эритроцитах. Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 5. Papillary cancer. Basophilic granularity is found in the thyrocyte cytoplasm and nucleus. Endoglobular inclusions of similar optical density are present in erythrocytes. Romanovsky–Giemsa staining

Рисунок 6. Папиллярный рак. Двуядерный тироцит с мелкой базофильной зернистостью в цитоплазме и участком повышенной оптической плотности на ядре. Незавершенный цитокинез. Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 6. Papillary cancer. A binuclear thyrocyte with fine basophilic granularity in the cytoplasm and an area of increased nuclear optical density. Incomplete cytokinesis. Romanovsky–Giemsa staining

Рисунок 7. Папиллярный рак. Полиморфные ядра тироцитов с вакуолями. В цитоплазме присутствует мелкая базофильная зернистость. Участки повышенной оптической плотности (шизогония) плотно прилегают к ядрам. Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 7. Papillary cancer. Thyrocyte polymorphic nuclei with vacuoles. A tiny basophilic granularity is observed in the cytoplasm. Areas of increased optical density (schizogony) are closely adjacent to the nuclei. Romanovsky–Giemsa staining

Рисунок 8. Папиллярный рак. Вакуолизированные и цитоадгезированные эритроциты с эндоглобулярными включениями. Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 8. Papillary cancer. Vacuolized and cytoadhesive erythrocytes with endoglobular inclusions. Romanovsky–Giemsa staining

Иллюстрации к статье «Злокачественные новообразования щитовидной железы человека как следствие кровепаразитарной (гемоспоридийной) инфекции» (авторы: А.В. Терлецкий, Л.Г. Ахмерова) (с. 257–274) (2-й фрагмент; начало см. на с. I; продолжение см. на с. III)

Illustrations for the article "Malignant human thyroid neoplasms associated with blood parasitic (haemosporidian) infection" (authors: Terletsky A.V., Akhmerova L.G.) (pp. 257–274) (2nd fragment; start on p. I, continued on p. III)

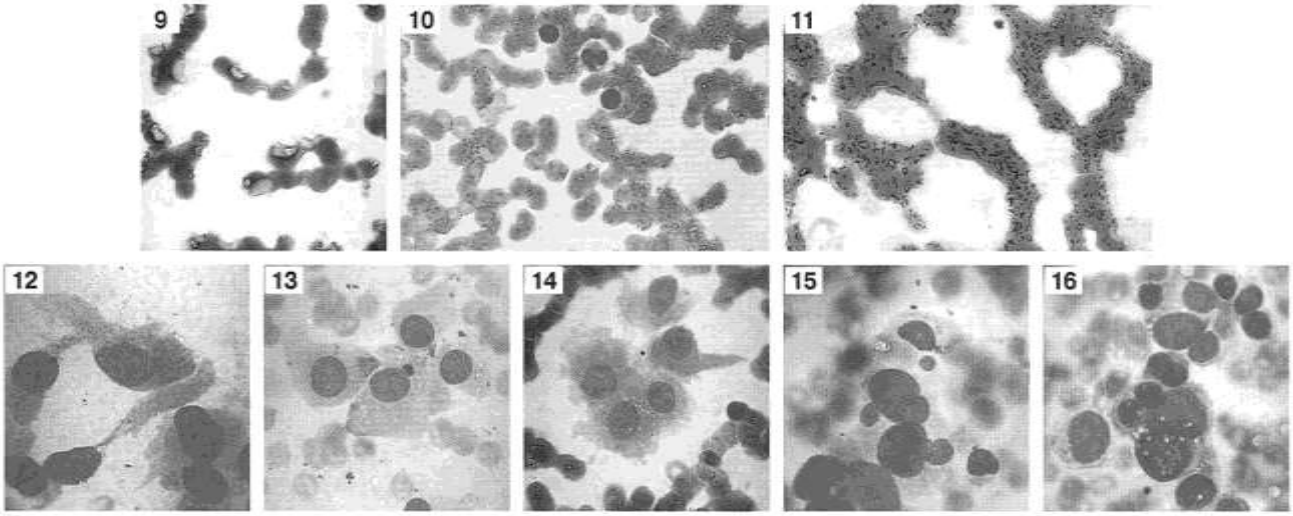


Рисунок 9. Папиллярный рак. Вакуолизированные и цитоадгезированные эритроциты с крупными эндоглобулярными включениями. Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 9. Papillary cancer. Vacuolized and cytoadhesive erythrocytes with large endoglobular inclusions. Romanovsky–Giemsa staining

Рисунок 10. Папиллярный рак. Цитоадгезированные эритроциты с множественными эндоглобулярными включениями в эритроцитах. Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 10. Papillary cancer. Cytoadhesive erythrocytes with multiple endoglobular inclusions. Romanovsky–Giemsa staining

Рисунок 11. Папиллярный рак. Выраженная цитоадгезия эритроцитов с эндоглобулярными включениями. Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 11. Papillary cancer. Prominent erythrocyte cytoadhesion with endoglobular inclusions. Romanovsky–Giemsa staining

Рисунок 12. Медуллярный рак. Веретеновидные тироциты с полиморфными ядрами, цитоплазма заполнена мелкими базофильными включениями. Очаги повышенной оптической плотности базофильной зернистости сконцентрированы на одном из полюсов тироцита вплотную к ядру. Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 12. Medullary carcinoma. Fusiform thyrocytes with polymorphic nuclei, the cytoplasm is filled with small basophilic inclusions. The foci of increased optical density of basophilic granularity are concentrated on one of the thyrocyte poles close to the nucleus. Romanovsky–Giemsa staining

Рисунок 13. Медуллярный рак. Тироциты с мелкой пылевидной розоватой зернистостью в цитоплазме и участком повышенной оптической плотности, прилегающим к ядру (шизогония). Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 13. Medullary carcinoma. Thyrocytes with small dusty pinkish granularity in the cytoplasm and an area of increased optical density adjacent to the nucleus (schizogony). Romanovsky–Giemsa staining

Рисунок 14. Медуллярный рак. Цитоплазма тироцитов заполнена мелкой сине-розовой пылевидной зернистостью. Крупные базофильные включения, присутствующие в цитоплазме, по оптической плотности идентичны эндоглобулярным включениям в эритроцитах. Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 14. Medullary carcinoma. The thyrocyte cytoplasm is filled with fine blue-pink dusty granules. Large basophilic inclusions in the cytoplasm are identical in optical density to erythrocyte endoglobular inclusions. Romanovsky–Giemsa staining

Рисунок 15. Медуллярный рак. Полиморфные ядра тироцитов и круглый микрошизонт гемоспоридий. Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 15. Medullary carcinoma. Thyrocyte polymorphic nuclei and a round haemosporidian microschizont. Romanovsky–Giemsa staining

Рисунок 16. Медуллярный рак. Полиморфноядерные тироциты с вакуолями в ядрах и цитоплазме. Окр. по Романовскому–Гимзе.

Figure 16. Medullary carcinoma. Polymorphonuclear thyrocytes with vacuoles in nuclei and cytoplasm. Romanovsky–Giemsa staining

Иллюстрации к статье «Злокачественные новообразования щитовидной железы человека как следствие кровепаразитарной (гемоспоридийной) инфекции» (авторы: А.В. Терлецкий, Л.Г. Ахмерова) (с. 257–274) (3-й фрагмент; начало см. на с. I–II; окончание см. на с. IV)

Illustrations for the article "Malignant human thyroid neoplasms associated with blood parasitic (haemosporidian) infection" (authors: Terletsky A.V., Akhmerova L.G.) (pp. 257–274) (3rd fragment; start on p. I–II, continued on p. IV)

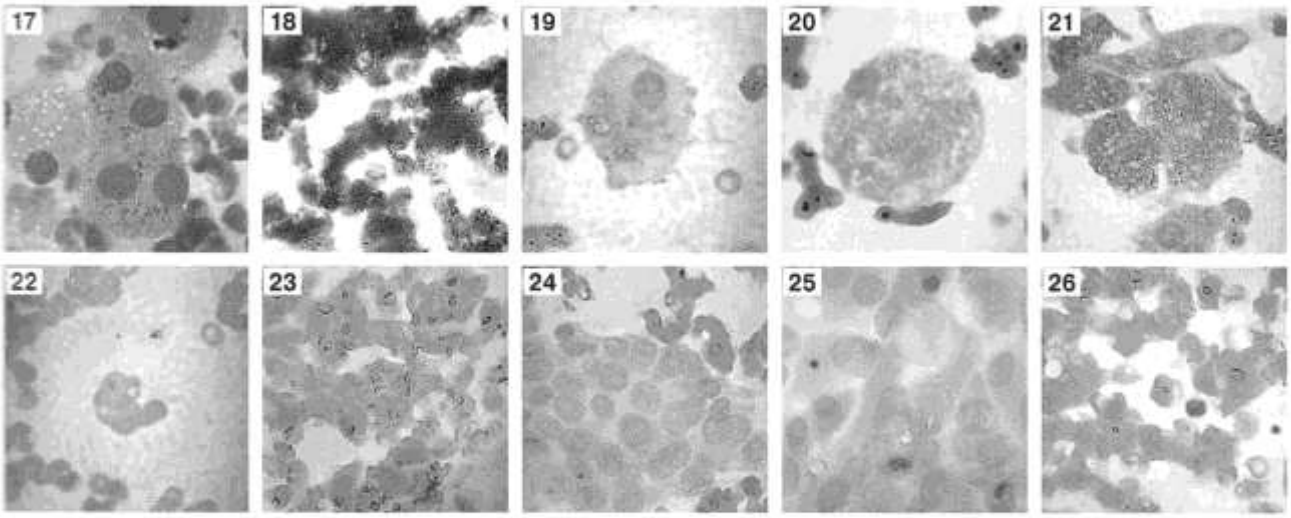


Рисунок 17. Медуллярный рак. Двуядерные и четырехъядерные тироциты с крупной базофильной зернистость в цитоплазме. Вакуоли в цитоплазме по размерам соответствуют базофильным включениям. Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 17. Medullary carcinoma. Binuclear and quadrinuclear thyrocytes with large basophilic granularity in the cytoplasm. Vacuoles in the cytoplasm correspond in size to basophilic inclusions. Romanovsky–Giemsa staining

Рисунок 18. Медуллярный рак. Цитоадгезия эритроцитов с множественными мелкими эндоглобулярными включениями в эритроцитах. Окр. по Романовскому–Гимзе

Figure 18. Medullary carcinoma. Cytoadhesion of erythrocytes with multiple small endoglobular inclusions in erythrocytes. Romanovsky–Giemsa staining

Рисунок 19. Фолликулярный рак. Ядра (ДНК) гемоспоридий в гиперплазированной цитоплазме тироцита и на его ядре. Ядро тироцита смещено к периферии клетки. Окр. по Фельгену

Figure 19. Follicular cancer. Nuclei (DNA) of haemosporidia in hyperplastic thyrocyte cytoplasm and on its nucleus. The thyrocyte nucleus is displaced to the cell periphery. Feulgen staining

Рисунок 20. Фолликулярный рак. Тироцит шаровидной формы со смещенным на периферию клетки ядром. Ядра (ДНК) гемоспоридий сиреневого цвета в цитоплазме тироцита. Окр. по Фельгену

Figure 20. Follicular cancer. A spherical thyrocyte with a nucleus displaced to the cell periphery. Nuclei (DNA) of haemosporidia of lilac color in the thyrocyte cytoplasm. Feulgen staining

Рисунок 21. Фолликулярный рак. Ядра (ДНК) тироцитов вакуолизированы, как и цитоплазма, и смещены на периферию клетки или деформированы (сжаты). Ядра (ДНК) гемоспоридий расположены в цитоплазме тироцитов и эритроцитах. Окр. по Фельгену

Figure 21. Follicular cancer. The nuclei (DNA) of thyrocytes are vacuolated, like the cytoplasm, and are displaced to the cell periphery or deformed (compressed). The nuclei (DNA) of haemosporidia are located in the cytoplasm of thyrocytes and erythrocytes. Feulgen staining

Рисунок 22. Фолликулярный рак. Мелкие ядра (ДНК) гемоспоридий внутри и по периферии эритроцитов. Окр. по Фельгену

Figure 22. Follicular cancer. Small nuclei (DNA) of haemosporidia inside and along the periphery of erythrocytes. Feulgen staining

Рисунок 23. Фолликулярный рак. Цитоадгезированные эритроциты с полиморфными ядрами (ДНК) гемоспоридий. Окр. по Фельгену

Figure 23. Follicular cancer. Cytoadhesive erythrocytes with polymorphic nuclei (DNA) of haemosporidia. Feulgen staining

Рисунок 24. Папиллярный рак. Ядра тироцитов полиморфные. ДНК гемоспоридий присутствует в виде мелких ядрышек на ядрах тироцитов и диффузно в цитоплазме. Окр. по Фельгену

Figure 24. Papillary cancer. Polymorphic nuclei in thyrocytes. Haemosporidian DNA is found as small nucleoli on thyrocyte nuclei and diffusely in the cytoplasm. Feulgen staining

Рисунок 25. Папиллярный рак. Ядра тироцитов полиморфные. По краям бороздки в ядре присутствует ДНК гемоспоридий. Микрошизонты гемоспоридий расположены у ядер тироцитов. Окр. по Фельгену

Figure 25. Papillary cancer. Polymorphic nuclei of thyrocytes. At the edges of the groove in the nucleus haemosporidian DNA is found. Haemosporidian microschizonts are located near the nuclei of thyrocytes. Feulgen staining

Рисунок 26. Папиллярный рак. Микрошизонт — «коховский шар» или «гранатное тело» — гемоспоридий среди эритроцитов. Полиморфные ядра (ДНК) гемоспоридий в эритроцитах крови. Окр. по Фельгену

Figure 26. Papillary cancer. Microschizont — "Koch' s body" or "pomegranate body" — of haemosporidia among erythrocytes. Polymorphic nuclei (DNA) of haemosporidia in erythrocytes. Feulgen staining

Иллюстрации к статье «Злокачественные новообразования щитовидной железы человека как следствие кровепаразитарной (гемоспоридийной) инфекции» (авторы: А.В. Терлецкий, Л.Г. Ахмерова) (с. 257–274) (4-й фрагмент; начало см. на с. I–III)

Illustrations for the article "Malignant human thyroid neoplasms associated with blood parasitic (haemosporidian) infection" (authors: Terletsky A.V., Akhmerova L.G.) (pp. 257–274) (4th fragment; start on p. I–III)

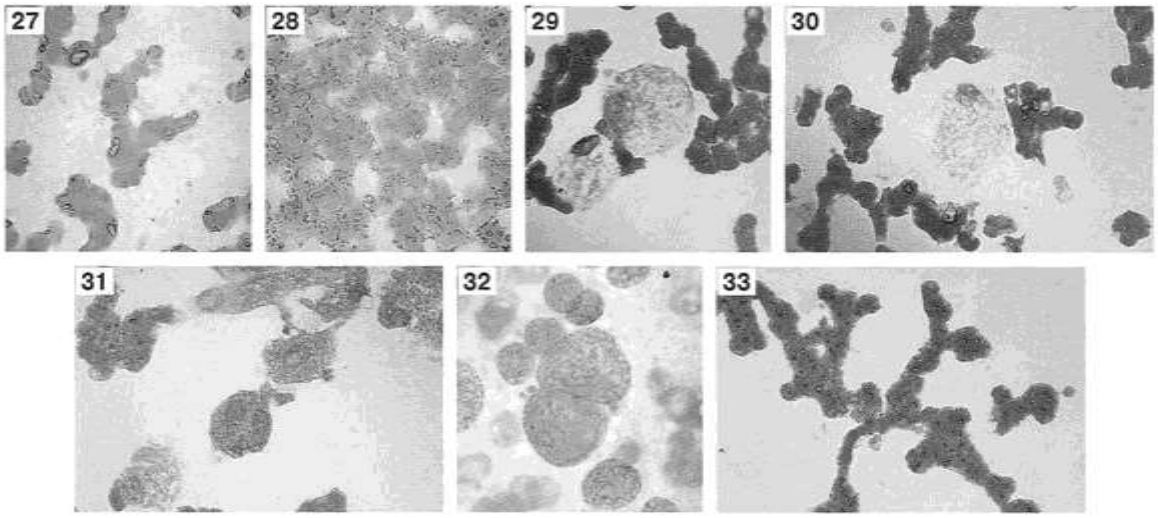


Рисунок 27. Папиллярный рак. Цитоадгезия эритроцитов крови с полиморфными ядрами (ДНК) гемоспоридий, крупные ядра которых (6–8 мкм) вместе с их протоплазмой могут занимать весь эритроцит. Окр. по Фельгену

Figure 27. Papillary cancer. Cytoadhesion of blood erythrocytes with polymorphic nuclei (DNA) of haemosporidia, large nuclei of which (6–8 μm), together with their protoplasm, can occupy the entire erythrocyte. Feulgen staining

Рисунок 28. Папиллярный рак. Ядра гемоспоридий полиморфные. Сильное поражение гемоспоридиями эритроцитов крови. Окр. по Фельгену

Figure 28. Papillary cancer. Haemosporidian nuclei are polymorphic. Severe haemosporidian damage to erythrocytes. Feulgen staining

Рисунок 29. Медуллярный рак. Ядра тироцитов вакуолизированы и располагаются эксцентрично в гиперплазированной шаровидной цитоплазме. Ядра (ДНК) гемоспоридий контурированы или расположены в цитоплазме тироцита диффузно. Окр. по Фельгену

Figure 29. Medullary carcinoma. The nuclei of thyrocytes are vacuolized and located eccentrically in the hyperplastic spherical cytoplasm. The nuclei (DNA) of haemosporidia are contoured or diffusely located in the cytoplasm of the thyrocyte. Feulgen staining

Рисунок 30. Медуллярный рак. Вакуолизированные ядро и цитоплазма тироцита после развития в нем гемоспоридийной инфекции. Окр. по Фельгену

Figure 30. Medullary carcinoma. Thyrocyte vacuolized nucleus and cytoplasm after the development of a haemosporidia infection in it. Feulgen staining

Рисунок 31. Медуллярный рак. Одно- и двуядерные тироциты. Цитоплазма тироцитов заполнена ДНК гемоспоридий в виде контурированых ядер или диффузно. Окр. по Фельгену

Figure 31. Medullary carcinoma. One- and two-nuclear thyrocytes. The cytoplasm of thyrocytes is filled with haemosporidian DNA in the form of contoured nuclei or diffusely. Feulgen staining

Рисунок 32. Медуллярный рак. Гиперплазированные ядра тироцитов. В цитоплазме и на ядрах видны округлые участки расположения гемоспоридийной ДНК. Окр. по Фельгену

Figure 32. Medullary carcinoma. Hyperplastic nuclei of thyrocytes. In the cytoplasm and on the nuclei, rounded areas of haemosporidian DNA are observed. Feulgen staining

Рисунок 33. Медуллярный рак. Вакуолизированные и цитоадгезированные эритроциты с ядрами (ДНК) гемоспоридий. Окр. по Фельгену

Figure 33. Medullary carcinoma. Vacuolized and cytoadhered erythrocytes with nuclei (DNA) of haemosporidia. Feulgen staining

присутствовать округлые включения с повышенной оптической плотностью от 2 до 5 мкм подобные участкам шизогонии. Окрашивание содержимого тироцита метиленовым синим свидетельствует о его кислотных свойствах. Ядра в гиперплазированных тироцитах могут быть смещены на периферию клетки, располагаться эксцентрично. В некоторых тироцитах присутствует одновременно два ядра, что свидетельствует о незавершенности цитокинеза при делении клетки. Рядом с тироцитами находятся одиночные или цитоадгезированные эритроциты с эндоглобулярными включениями, видна вакуолизация эритроцитов (рис. 3).

2. При ПР (рис. 4–7) — в тироцитах и плазме крови, окрашенных по Романовскому–Гимзе, выявлена мелкая базофильная зернистость 0,1–1,0 мкм, свидетельствующая о кислом характере структуры. В тироцитах находились множественные мелкие включения с участками повышенной оптической плотности подобной шизогонии. Заполнение базофильной зернистостью всей цитоплазмы клетки придает ей шаровидную форму. Базофильная зернистость в тироцитах по своей оптической плотности идентична эндоглобулярным включениям в эритроцитах. В цитоплазме тироцитов можно увидеть крупные круглые образования повышенной оптической плотности (от 5 до 10 мкм). Мелкая базофильная зернистость при микроскопии выявляется не только в цитоплазме, но и в ядрах, и внутри вакуолей ядер тироцитов. Из-за внутриклеточной базофильной зернистости цитоплазма клетки гиперплазируется и увеличивается по сравнению с размером ядра в несколько раз. В клетках, цитоплазма которых заполнена множественными базофильными включениями, при митозе не завершается цитокинез, поэтому в тироците могут присутствовать два и более ядра с выраженным полиморфизмом. В последующем базофильная зернистость исчезает, а в цитоплазме отмечается выраженная вакуолизация. Присутствие в узловых образованиях ЩЖ подобных тироцитов свидетельствует об отсутствии их литической гибели, связаной, скорее всего, с блокированием апоптоза. Деструкция цитоплазмы и ядра тироцита, естественно, снижает или тормозит его секреторную функцию. Исследование эритроцитов крови, попадающих в мазок при ТАПБ, показало наличие в эритроцитах беспигментных полиморфных эндоглобулярных включений. Эритроциты при этом цитоадгезированы и вакуолизированы, что наблюдается при кровепаразитарных (гемоспоридийных) инфекциях (рис. 8–11).

3. При МР — выявлены веретенообразные клетки, заполненные мелкой базофильной зернистостью размерами от 0,1 до 1,0 мкм, с высокой оптической плотностью у одного из полюсов клетки, прилегающей непосредственно к ядру тироцита. Базофильная окраска зернистости свидетельствует о наличии кислой структуры в цитоплазме клетки. Процесс компактной концентрации базофильной зернистости около ядра клетки наблюдается, как правило, при шизогонии гемоспоридийной инфекции. Базофильная зернистость в тироцитах по своей оптической плотности совпадает с эндоглобулярными включениями в эритроцитах. В цитологическом материале встречаются макро- и микрошизонты гемоспоридийной инфекции подобные таковым при тейлериозе. Наличие дву- и четырехядерных тироцитов свидетельствует о незавершенности цитокинеза. В четырехядерных тироцитах отмечается наличие более крупной по размерам базофильной зернистости. В двуядерных тироцитах прослеживается вакуолизация цитоплазмы и ядер, которые могут быть гиперплазированы в 3–4 раза по сравнению с нормальными тироцитами (рис. 12–17). Эритрорциты в мазках содержат полиморфные эндоглобулярные включения, отмечается выраженая цитоадгезия эритроцитов, что свойственно гемоспоридийным инфекциям (рис. 18).

В результате окрашивания цитологических мазков ТАПБ по Фельгену реактивом Шиффа удалось:

1. При ФР: выявить ядерную ДНК тироцитов и паразитарную ДНК (ядра гемоспоридий) в виде точечных включений, кольцевых форм и диффузно распределенную в цитоплазме фиолетового или красно-фиолетового цвета. Отмечена выраженная вакуолизация ядер и цитоплазмы, ядра тироцитов при этом деформированы, уплощены и смещены к периферии клетки. В отдельных тироцитах присутствуют два ядра, что свидетельствует о незавершенности цитокинеза. Большинство эндоглобулярных включений в тироцитах и эритроцитах по размерам совпадают (рис. 19–21). Эритроциты, первоначально окрашенные эозином в оранжевый цвет, содержали ядра (ДНК) гемоспоридий красно-фиолетового цвета. Ядра гемоспоридий в эритроцитах варьировали от 0.1 до 8 мкм, мелкие ядра располагались как внутри эритроцитов, так и по периферии. Крупные ядра гемоспоридий могут занимать все пространство эритроцита (рис. 22–23).

2. При ПР: выявить ядерную ДНК тироцитов и паразитарную ДНК в виде точечных включений, диффузно распределенную в гипертрофированной цитоплазме тироцитов. В гиперплазированной цитоплазме могут распологаться эксцентрично два и более полиморфных ядра. Внутри цитоплазмы тироцитов и между эритроцитами удалось локализовать микрошизон-

ты гемоспоридий (рис. 24–26). В эритроцитах крови при окрашивании выявили ДНК (ядра) гемоспоридий разных размеров, окрашенных в красно-фиолетовый цвет. В эритроцитах присутствуют кольцевые формы ядер гемоспоридий, а также разные полиморфные ядра от 0,1 до 8 мкм в длину, в отдельных эритроцитах находили от 1 до 16 и более ядер гемоспоридий. Отмечается выраженная цитоадгезия эритроцитов (рис. 27–28).

3. При МР: определить ядра (ДНК) в гиперплазированной цитоплазме тироцитов, расположенные чаще эксцентрично. В цитоплазме тироцитов располагаются диффузно или контурированно ядра (ДНК) гемоспоридий красно-фиолетового цвета (рис. 29–32). Вследствие паразитирования гемоспоридий в тироцитах цитоплазма гиперплазируется и увеличивается по сравнению с ядром в 10 и более раз. Цитоплазма тироцитов может быть заполнена гемоспоридийной ДНК до такого состояния, что клетки приобретают веретенообразную или шаровидную форму. Вакуоли в цитоплазме и ядре, которые были хорошо видны при окрашивании по Романовскому–Гимзе (рис. 16), при окрашивании реактивом Шиффа по Фельгену приобрели красно-фиолетовый цвет (рис. 32), что свидетельствует о наличии чужеродной ДНК в структуре ядерного материала тироцита и его цитоплазмы. Наличие чужеродной ДНК (гемоспоридийной) в ядре тироцита препятствует, вероятно, нормальному делению клеток, и ядра инфицированных тироцитов по размерам в 4 раза превосходят нормальные здоровые ядра. Энергетический метаболизм инфицированных гемоспоридиями тироцитов будет повышаться, а физиологическая функция снижаться, в связи с нарушением гемоспоридиями внутренней цитоплазматической структуры (компартментов клетки). Эритроциты, присутствующие в мазках, вакуолизированы, цитоадгезированы и заполнены ядрами гемоспоридий красно-фиолетового цвета. Выраженая цитоадгезия пораженных гемоспоридиями эритроцитов оказывает существенное влияние на локальную и общую гемодинамику (рис. 33). Выявленная в эритроцитах крови ДНК, окрашенная по Фельгену в красно-фиолетовый цвет, однозначно свидетельствует о наличии кровепаразитарной (гемоспоридийной) инфекции. Наличие ДНК в эритроцитах без пигмента гемозоина (гемомеланина) характерно для бабезий и тейлерий. В нашем исследовании пигмент гемозоин (гемомеланин) в эритроцитах отсутствовал, что позволило исключить в образцах наличие малярийного плазмодия. Предполагаем возможное присутствие в мазках еще неизученного вида гемоспоридий. Ядерный полиморфизм гемоспоридий в эритроцитах может свидетельствовать о разных видах и/или генерациях возбудителя. Неокрашенная специальным красителем протоплазма кровепаразитарной инфекции выявлялась виде светлой полосы вокруг ядер в эритроцитах.

Следовательно, внутриклеточное паразитирование гемоспоридийной инфекции в тироцитах может приводить к выраженной гиперплазии клетки, ее вакуолизации после шизогонии, к ярко выраженному полиморфизму ядер и многоядерности тироцитов с их деформацией и вакуолизацией. Ядра тироцитов могут как гиперплазироваться, так и уменьшаться в размерах с последующей деградацией. Деформация ядра часто проявляется при этом в виде уменьшения его размеров, уплощения и смещения на периферию клетки (эксцентричное расположение), с высокой вероятностью возникновения мутаций и делеций ДНК пораженных клеток, достигающих неопластического уровня.

Обсуждение

Рак — многофакторное и сложное заболевание, результат генетических и эпигенетических изменений клетки, нарушающих ее нормальное функционирование. Окружающая среда и генетический состав играют важную роль в предрасположенности к развитию болезни [51].

Большинство видов рака являются генетически нестабильными, истоки этой нестабильности и молекулярные механизмы, ответственные за индуцирование канцерогенных мутаций и перестроек, многочисленны и в некоторых случаях неясны. Разрешение и масштаб генетической нестабильности существенно различаются: от незначительных изменений последовательности, включающих замены оснований, делеции или вставки нескольких нуклеотидов, до анеуплоидии и серьезных изменений в структуре хромосом [90].

Проблемы рака, однако, намного сложнее, чем просто мутации в геноме. Они связаны, главным образом, с многочисленными взаимодействиями собственно раковых мутирующих клеток с клетками окружающей среды, в частности с иммунными клетками. Раковые клетки эволюционируют и приобретают способность избегать уничтожения иммунной системой. Они начинают ингибировать иммунную систему [13].

Благоприятствующими раку состояниями являются: нестабильность генома, воспалительные процессы перед возникновением и в процессе образования опухоли [75].

В концепцию же общих признаков рака входят: стимуляция роста, уклонение от супрессоров роста, резистентность к апоптозу, репликативное бессмертие, индукция ангиогенеза,

активация инвазии и метастазирования, уклонение от иммунной системы, аномальные метаболические пути [74].

С позиции только вирусной теории не могли быть объяснены все формы злокачественного роста. По мнению исследователей, вирусный этиологический фактор был выбран в качестве основного теми, чьи научные интересы были в большей степени сосредоточены на вирусах, нежели чем на опухолях в их бесконечном разнообразии. Высказывалось мнение, что вирусная теория злокачественного роста не должна занимать доминирующего и подавляющего положения по отношению к другим теориям опухолевого роста [9].

В настоящее время признается, что повреждение генома патогенными инфектами способствует онкогенезу, и в 20% всех онкологических заболеваний человека их считают основным фактором, инициирующим развитие рака, а некоторые инфекционные агенты классифицируют как прямые канцерогены [57, 78].

Некоторые патогены кодируют белки, необходимые для поддержания их собственной генетической целостности (например, бактерии), тогда как другие в значительной степени зависят от механизмов хозяина (например, вирусы). Патогены воздействуют на геномы клетки-хозяина напрямую через генотоксины и онкопротеины, которые вызывают изменения клеточной ДНК и нарушают механизмы репарации ДНК. Многие бактерии и паразиты секретируемыми ими белками могут проникать в ядра инфицированных клеток и вмешиваться в регуляцию хроматина, вызывая повреждения ДНК. Подавление экспрессии генов клетки-хозяина способствует эффективной внутриклеточной репликации инфекта [34, 35, 123].

Инфекционные патогены могут влиять на клеточные функции, трансформируя их в типичные для рака и приводя к появлению таких признаков, как пролиферация, уклонение от подавления роста, предотвращение апоптоза и иммуноопосредованного разрушения, изменение клеточного энергетического обмена [75, 109]. Они могут действовать как прямые канцерогены или косвенно способствовать онкогенезу за счет индукции хронического воспаления, что приводит либо к локализованным мутационным изменениям, либо глобальным хромосомным дефектам, которые являются особенностями геномного ландшафта рака [143].

Инфекционные агенты развивают сложные механизмы взаимодействия с путями метаболизма клетки-хозяина, подчиняя и контролируя генетический и эпигенетический механизмы, чтобы изменить фенотипическое состояние [98]. Внутриклеточные эукариотические паразиты захватывают клеточные метаболические пути, чтобы манипулировать эпигеномом клетки-хозяина, клеточными механизмами, сигнальными путями и эпигенетическими программами и метками, такими как метилирование и ацетилирование, для собственной выгоды. Они могут преодолевать клеточные барьеры и использовать сигнальные пути для защиты инфицированной клетки от иммунитета хозяина. Развитие опухолей может начинаться с хронического воспаления, вызванного эукариотическими внутриклеточными паразитами, которые, проникая в клетку, подчиняют и контролируют клеточный аппарат хозяина, используя его для собственных биологических потребностей, активируя онкогены и инактивируя гены-супрессоры опухолей [51]. Таким образом, эукариотические паразиты способны воспроизводить определенные механизмы туморогенеза, приводя к раку, либо в качестве моноагента, либо в комбинации (ассоциации) с факторами окружающей среды. Синергизм патогенного вирусно-бактериально-протозойного микробиоценоза может существенно ускорять онкогенез и усугублять его клиническое течение.

Если онкогенный потенциал у вирусов хорошо изучен, а для бактерий он изучается в настоящее время [40, 89, 125, 144], то гипотеза о потенциальном участии внутриклеточных эукариотических паразитов в развитии рака до сих пор в значительной степени игнорировалась [51] или воспринималась медицинским и научным сообществом с большой долей скептицизма. При этом эпидемиологические и клинические наблюдения показывают, что внутриклеточные эукариотические простейшие (тип *Apicomplexa*) вызывают заболевания животных и человека, и могут быть связаны с различными видами рака [26, 48, 54, 83, 85, 121, 134, 135, 140, 141].

Бабезии (пироплазмы) были выявлены у человека при лимфоцитарном лейкозе и раке толстой кишки [54], гепатобластоме [121], лимфоме Ходжкина [65], при подозрении на злокачественный гистиоцитоз [29]. У животных при хроническом паразитоносительстве картина крови при бабезиозе и лейкозе не различается [14]. При размножении бабезий, а также тейлерий в кроветворных органах тормозится эритропоэз и одновременно происходит разрушение эритроцитов, развивается анемия. Нарушаются газовый и белковый обмены, возникает стойкая гипоксия.

Гемоспоридийная инфекция может протекать как моноинфекция или как смешанная инвазия с одновременным паразитированием нескольких видов, относящихся к разным родам [5, 8, 15]. В эксперименте у собак в Ростовской области методом ПЦР выявлено моноинфицирование *B. canis*, а также одновременная микст-

инвазия *B. canis* и *B. vogeli*. В остальных случаях идентифицировать вид бабезий не удалось [3]. В Европе у псовых могут присутствовать в крови *B. canis vogeli*, *B. canis canis*, *Th. annae* и *B. equi (B. equi)*, у лошади — *B. equi* и *B. canis canis* [56]. У крупного рогатого скота бабезиоз (пироплазмоз) в большинстве случаев протекает в виде смешанной инвазии с тейлериозом, франсаиеллезом и анаплазмозом [16, 21].

Огромное видовое разнообразие патогенных зоонозных и зооантропонозных гемоспоридий с различной вирулентностью и индивидуальной избирательной тропностью к органам и тканям может провоцировать у неспецифических теплокровных хозяев клиническую манифестацию, свойственную другим заболеваниям, либо латентное течение, что затрудняет раннюю диагностику и своевременное лечение пациентов.

Если острая форма заболевания у человека и животного в ряде случаев не вызывает сомнения при постановке диагноза, то хроническое течение заболевания диагностируется крайне редко. Часто симптомы при хронической форме ошибочно интерпретируют как признаки онкологического заболевания [65].

На один клинический случай бабезиоза (пироплазмоза) у людей, как было замечено ранее, приходятся сотни случаев бессимптомного паразитоносительства [117]. В эритроцитах теплокровного хозяина гемоспоридии (*B.* spp. и *Th.* spp.) могут размножаться простым бинарным асинхронным делением каждые 6–8 ч [27, 114] или почкованием с последующим выходом мерозоитов в плазму, множественным делением в паренхиматозных органах, эндотелии сосудов и клетках белой крови (шизогония), в отличие от *Plasmodium*, где синхронное деление паразита происходит каждые 48–72 ч в зависимости от вида. Диссеминирование по организму осуществляется посредством зараженных эритроцитов, свободно «плавающих» в крови мерозоитов и внеэритроцитарных форм развития гемоспоридий.

Развитие *B. ovis* в крови овец приводит к повышению газового и энергетического обменов, при этом коэффициент утилизации кислорода на высоте инвазии снижается [17]. При исследовании окислительного повреждения эритроцитов собак, инфицированных *B. gibsoni*, было установлено, что у животных с высоким уровнем паразитемии отмечается значительное увеличение концентрации метгемоглобина (metHb) и малонового диальдегида (MDA) в эритроцитах по сравнению с таковыми у неинфицированных собак. Окислительное повреждение эритроцитов было вызвано размножением *B. gibsoni*, неинфицированные эритроциты также подвергались окислительному стрессу при заражении [113]. У больных бабезиозом собак установлена корреляция между низким уровнем тироксина ЩЖ и высокой смертностью, а также высоким уровнем кортизола и АКТГ [126, 145]. Малоновый диальдегид является естественным продуктом перекисного окисления липидов и биосинтеза простагландинов и способен реагировать с ДНК, образуя ДНК-аддукты, в первую очередь мутагенный M1G, который, по-видимому, вносит значительный вклад в канцерогенез у людей [96, 97]. Изменяется пластичность инфицированных эритроцитов, они плохо проникают в мелкие сосуды и капилляры [41]. Цитоадгезия пораженных эритроцитов в мелких сосудах, обусловленная выбросом гемоспоридиями на мембраны эритроцитов цитоадгезивных лигандов, приводит к выраженному нарушению микроциркуляции крови в тканях и усилению гипоксии [116].

Наиболее четкие прямые связи между одноклеточными простейшими и туморогенезом прослеживаются у представителей сем. *Theileria*.

При тейлериозе КРС *Th. annulata*, *Th. parva*, *Th. leostoquardi* и *Th. taurotragii* способны вызывать неконтролируемую пролиферацию лимфоцитов, приводящую к увеличению лимфатических узлов. При инфицировании лейкоцитов происходит стимуляция деления клеток миелоидного ряда, что приводит к образованию опухолей с метастатическим/инвазивным потенциалом, превращает клетки в характерные для некоторых видов рака, с иммортализацией, гиперпролиферацией и диссеминацией [53, 61, 139]. Трансформация включает паразитарнозависимые нарушения путей передачи сигнала лейкоцитов, которые регулируют апоптоз, деление и экспрессию генов.

В отличие от многих представителей филума *Apicomplexa*, тейлерии находятся не внутри паразитоформной вакуоли, а в цитозоле инфицированной клетки в виде шизонтов — «коховского шара» или «гранатного тела». Во время митоза инфицированных клеток шизонты тейлерий связываются с митотическим веретеном клетки хозяина, обеспечивая сегрегацию в обе дочерние клетки с большой эффективностью для поддержания скорости инфицирования [15]. Поры мембран шизонта *Theileria* и ядра клетки-хозяина плотно прилегают друг к другу, что позволяет паразиту секретируемыми внутрь ядра белками влиять на геном инфицированной клетки [81]. Тейлерии секретирует белки, которые содержат ДНК-связывающие домены (мотивы AT-hook), которые локализуются в ядре клетки-хозяина во время инфекции и обладают способностью модулировать фенотип инфицированной клетки, контролировать деление клеток-хозяина и апоптоз [136, 137]. Поскольку жизнедеятельность паразита и клетки организ-

ма хозяина тесно связаны, у некоторых видов тейлерий появились механизмы, способствующие необратимой реконфигурации экспрессии генов и трансформации фенотипа инфицированных клеток хозяина [85, 131]. Описаны сигнальные пути клетки-хозяина, которые способствуют трансформации, включая активацию онкогенов c-Jun и Myc [50, 53, 129, 131, 139]. Клеточная трансформация, индуцированная *Theileria* на стадии макрошизонта, сопровождается модуляцией ферментов, модифицирующих гистоны хозяина. К таким относится метилтрансфераза H3K4 SMYD3, которая способствует появлению трансформированных и метастатических фенотипов клеток [55]. *Th. parva* трансформирует бычьи B- и T-лимфоциты, и *Th. annulata* — макрофаги, дендритные клетки и B-клетки [133].

Характерной особенностью растущих опухолевых клеток по теории Отто Варбурга является повышенная скорость гликолиза в них и снижение потребления кислорода при достаточном его поступлении [цит. по 140, 142]. По теории опухолевые клетки имеют дефекты митохондриального окислительного фосфорилирования и полагаются на высокий уровень аэробного гликолиза как основного источника АТФ, способствующего клеточной пролиферации (эффект Варбурга), в этом проявляется отличие от нормальных клеток, использующих окислительное фосфорилирование для роста и развития. Гликолиз обеспечивает не только энергией, но и основными веществами для синтеза АТФ [118]. Сохраняя свою способность к дыханию, опухоли «становятся более паразитическими», увеличивая метаболизм глюкозы из окружающих тканей. За счет оттока молочной кислоты и протонов опухоль создает «ядовитую» среду для окружающих нормальных тканей, что, скорее всего, способствует появлению «зоны смерти» вокруг опухоли, в которую она может медленно вторгаться [101]. Митохондриям принадлежит роль в регуляции гибели клеток, а большинство опухолевых клеток устойчивы к апоптозу [70].

Шизонты тейлерий наделяют зараженные лейкоциты способностью к инвазии, свойственной раковым клеткам, индуцируя эффект Варбурга, определяемый переходом генерации АТФ от преимущественно окислительного фосфорилирования к гликолизу. Внутри лейкоцитов хозяина гемоспоридийная инфекция прямо или косвенно вызывает повышенную выработку активных форм кислорода (АФК). Индуцированная паразитом сверхэкспрессия гликолитических ферментов, нарушающая баланс АФК и вызывающая окислительно-восстановительный стресс, и связанная с ним стабилизация фактора, индуцируемого гипоксией 1-альфа (HIF-1α), являются также ключевыми регуляторами метаболизма раковых клеток. Сдвиг в метаболизме глюкозы представляет собой эффективный способ обеспечения питательными веществами, которые необходимы для пролиферации и поддержания жизнедеятельности тейлерий в клетке-хозяине. Таким образом, метаболические потребности внутриклеточного паразита приводят к метаболическому перепрограммированию клетки-хозяина. Тейлерии секретируют белки в компартменты клетки организма хозяина, изменяя метаболизм глюкозы посредством регуляции HIF-1α, тем самым непосредственно воздействуя на процессы метаболического гомеостаза [105, 110, 111, 140]. При некоторых видах рака генетические изменения в генах TP53, MYC и PI3K играют роль в индукции эффекта Варбурга [44]. Тейлерии способны индуцировать эффект Варбурга, манипулируя (управляя) белками этих генов в клетках хозяина [140]. Появление эффекта Варбурга может быть обусловлено митохондриями шизонта, в котором может находиться 150–200 ядер тейлерий [15].

Важной особенностью при трансформации нормальных клеток в раковые при внутриклеточном паразитировании тейлерий является ее обратимость. Уничтожение тейлерий тормозит процесс трансформации клеток хозяина и устраняет эффект Варбурга. Обратное развитие эффекта Варбурга связано с инактивацией HIF-1α, потерей экспрессии ключевых HIF-1α-регулируемых гликолитических ферментов и последующей реверсией трансформированных фенотипов. Это показывает, что эффект Варбурга непосредственно способствует установлению или поддержанию трансформированного фенотипа, что является первым шагом к развитию опухоли из клеток, инфицированных тейлериями. Окислительный же стресс, вызванный присутствием паразита в цитоплазме хозяина, необходим для хронической активации HIF-1α [105, 106].

Адаптация раковых клеток к их микросреде — важная движущая сила в клональном отборе, который приводит к инвазивным и метастатическим заболеваниям. Концентрация кислорода заметно снижается при многих раковых заболеваниях человека по сравнению с нормальной тканью и является основным механизмом, опосредующим адаптивные реакции на сниженный уровень кислорода (гипоксию) — это регуляция транскрипции HIF-1α [127, 128]. Карциномы человека часто содержат участки некроза, в которых раковые клетки погибают из-за недостаточной оксигенации [36, 77]. Клетки, прилежащие к перфузионному кровеносному сосуду, взаимодействуют с высокими концентрациями кислорода, которые уменьша-

ются по мере увеличения расстояния от сосуда вглубь ткани. Такие изменения концентрации кислорода существуют и в нормальных тканях, при раке они намного больше, а концентрация кислорода падает почти до нуля в местах некроза. Помимо физических градиентов, внутри опухолей также часто возникают временные колебания оксигенации [59]. Большинство физиологических функций клеток модулируется в соответствии с клеточными концентрациями кислорода. Эти адаптивные ответы сохраняются и поддерживаются раковыми клетками, в которых нормальные механизмы обратной связи были нарушены соматической мутацией и эпигенетическими изменениями. В результате адаптация к гипоксии способствует развитию многих ключевых аспектов прогрессирования рака [77, 128]. Активация HIF-1α важна для поддержания энергетического гомеостаза и углеводного обмена при низкой концентрации кислорода. Помимо регуляции энергетического гомеостаза в опухолевых клетках, HIF-1α повышает клеточную адгезию к эндотелиальным клеткам. Адгезия раковых клеток к эндотелиальным клеткам, опосредованная селектинами и их углеводными лигандами, по всей вероятности, играет важную роль в метастазировании рака и васкулогенезе, связанном с прогрессированием опухоли. HIF непосредственно участвуют в стимулировании ангиогенеза опухоли, запуская транскрипцию фактора роста эндотелия сосудов для преодоления гипоксической среды. Таким образом, показана роль HIF1α в метастазировании опухолевых клеток, адгезии, ангиогенезе и росте опухолей [86, 140].

Инфицированые тейлериями клетки организма хозяина приобретают репликативное бессмертие, их можно неограниченно долго культивировать *in vitro*, как любую стандартную клеточную линию [69]. Превращение клеток, инфицированных шизонтами тейлерий, в бессмертные клеточные линии связано с приобретением ими свойств, типичных и характерных для некоторых раковых клеток, — это избегание иммунного ответа организма-хозяина и устойчивость к апоптозу [139].

Иммунное уклонение тейлерий заключается в модуляции инфектом иммунного ответа самого хозяина. Инфицированные *Th. annulata* макрофаги крупного рогатого скота теряют некоторые функции, такие как Fc-опосредованный фагоцитоз и продуцирование антимикробных молекул, включая оксид азота и TNFα [83]. Они активируют некоторые цитокины, играющие решающую роль в иммунных реакциях против паразитов. Во время эффективных иммунных ответов основным цитокином является IL-2, но чувствительность к IL-2 носит временный характер с небольшими контролируемыми «всплесками» продукции IFNγ. У животных, перенесших первичную инфекцию, продукция IFNγ значительно повышена, но IFNγ, по-видимому, не контролирует зараженные паразитами клетки (большое количество макрофагов входит в клеточный цикл развития во время пикового периода продукции IFNγ) и может даже способствовать росту инфицированных макрофагов. Замечено также, что цитотоксические Т-лимфоциты (CTLs) неспособны лизировать клетки, инфицированные макрошизонтами [25, 26, 46, 47]. Это может быть одной из причин, по которой *Th.* annulata не подавляется с помощью ответа Th1, хотя это обычно имеет место для других простейших, инфицирующих макрофаги [45, 47]. Профили цитокинов клонов Т-клеток, инфицированных тейлериями, значительно различаются, даже в подгруппах Т-клеток, что указывает на то, что тейлерии могут вызывать случайные эффекты в клетках-хозяевах [104]. Ингибирование гибели инфицированных тейлериями клеток (блокирование апоптоза и продление жизни клетки) используют многие внутриклеточные протозойные паразиты для обеспечения перехода на следующий этап их жизненного цикла и передачи между хозяевами [71]. Способность гемоспоридий к длительному персистированию в иммунном организме млекопитающего свидетельствует о том, что они в процессе эволюции разработали стратегию избегания и уклонения от иммунных ответов хозяина, значительно увеличивая тем самым вероятность распространения. Изменение антигенной структуры микроорганизмов (выброс ложных белков-антигенов) способствует эффективному противостоянию факторам иммунной защиты макроорганизма [27, 38, 39].

Шизонты тейлерий бесконтрольно размножаются в макрофагах и лимфоцитах хозяина. Для установления фенотипа инфицированных клеток сразу после инвазии шизонт активирует антиапоптотические белки, такие как c-FLIP, IAPs, Bcl-2, Bcl-XL, путем активации мультисубъединичной киназы IκB (IKK) и протоонкогенные белки, такие как C-myc, антиапоптотические гены, такие как C-FLIP, Bcl-2 и матричный металлопротеин (MMP9), в основном нацеливаясь на сигнальные пути хозяина, такие как NF-κB, JNK/AKT, JAK/STAT, фосфоинозитид-3-киназа (PI3-K)/MAPK и TGF-β2 [58, 60, 71, 80, 85]. Тейлерии секвестируют белок-супрессор опухолей p53 на своей поверхности с последующим предотвращением ядерной транслокации и ингибированием пути апоптоза p 53 [73]. Инфекция *Th. parva* также придает устойчивость к индуцированному Fas/FasL апоптозу [87], что может иметь решающее значение для уклонения от цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLs) [32] и вызванной акти-

вацией гибели клеток [72]. Регуляция этих сигнальных путей хозяина вызывает постоянное выживание и пролиферацию инфицированных паразитом клеток [49]. Увеличение популяции зараженных лимфоцитов приводит к развитию множественных опухолевидных очагов по всему телу инфицированного животного.

Накопление и функция белка p53 нарушались в клетках, инфицированных *Th. parva*, после того как цисплатин индуцировал повреждение ДНК, несмотря на повышенный уровень транскрипции p53. Сверхэкспрессия гена MDM2, отрицательного регулятора опухолевого супрессора p53, тесно связана с ингибированием p53-зависимого апоптоза лимфоцитов, инфицированных *Th. parva* [79]. Показано, что паразиты *Theileria* блокируют и секвестрируют белок p53 на своей собственной поверхности и в цитозоле хозяина, препятствуя выполнению его роли в поддержании геномной стабильности [73].

Тейлерии при заражении лейкоцитов хозяина изменяют экспрессию miR-155 хозяина, вызывая эпигенетическую перестройку регуляторных цепей и способствуя трансформации лейкоцитов [99, 146]. Инфицированные тейлериями клетки организма хозяина активируют miR-155, повышая скорость спонтанных мутаций и вызывая геномную нестабильность подавлением генов, участвующих в репарации ДНК [138].

Трансформация клеток организма хозяина, инфицированных *Th. annulata*, происходит за счет активации экспрессии гистонметилтрансферазы SMYD3 (SET and MYND-domain containing 3), которая кодирует ди- и триметилтрансферазу гистона H3K4 и способствует инвазии рака за счет эпигенетической активации металлопротеиназы MMP-9, играющей важную роль в онкогенезе, метастазировании, ангиогенезе и инвазии клеток [55, 139].

Метилирование играет важную роль в сохранении целостности генома. При злокачественных опухолях часто выявляют аберрантное метилирование промоторных областей гена, что связано с потерей функции гена. Это изменение ДНК представляет собой наследуемое состояние, не опосредованное измененной последовательностью нуклеотидов, которое, по-видимому, тесно связано с образованием транскрипционно-репрессивного хроматина. Этот эпигенетический процесс действует как альтернатива мутациям, чтобы нарушить функцию генов-супрессоров опухолей [122], и может предрасполагать к генетическим изменениям за счет инактивации генов репарации ДНК [33].

Подвижность, инвазивность и диссеминирование по организму инфицированных тейлериями клеток организма хозяина активизируются зависимой от паразита динамикой F-актина и хронической индукцией TNFα, способствующей активации MAP4K4 (эволюционной консервативной киназы), которая контролирует динамику цитоскелета и подвижность клеток [93].

Сигналами для трансформации близлежащих клеток могут являться молодые мерозоиты, которые при выходе в межклеточное пространство из инфицированных клеток вовлекают в патологический процесс близлежащие здоровые ткани.

Трансформация фенотипа клетки организма хозяина, индуцированная тейлериями, характеризуется сильным перепрограммированием сигнальных путей, а также эпигенетическими механизмами и обнаруживает сходство с другими потенциально онкогенными эукариотами филума *Apicomplexa*. [52, 130, 139]. Перепрограммированная клетка обязательно будет содержать какое-то число мутаций, возникающих стохастически и с непредсказуемым воздействием на фенотип новой клетки [13].

При раке ЩЖ наблюдаются не случайные, а повторяющиеся в опухолях виды мутаций, для выявления которых проводятся лабораторные исследования, — BRAF, и другие маркеры, такие как RET/PTC, PAX8/PPARγ, RAS, TERT и пр. [6].

Из представленного материала видно, что тейлерии при паразитировании способны воспроизводить перечисленные в публикации [74] признаки онкологического заболевания.

Клиническое проявление бабезиоза и тейлериоза изначально связывали с клещевым вектором передачи. Сейчас известна роль «лучистых телец» — определенной стадии жизненного цикла гемоспоридийных инфекций, возникающих из яйцевидной эритроцитарной стадии (гамонтов) [107] и передающихся кровососущими насекомыми (гнусом) — слепнями, мошками, комарами, мухами, мокрецами [5, 7, 11, 15]. В Европе и Южной Африке у собак были выделены *Th. equi*, *Th. annulata* и *Th.* spp.; источник передачи не установлен [82].

Заражение человека бабезиями возможно при переливании донорской крови и ее продуктов [23, 62, 63, 132], трансплацентарно [24, 66, 67, 84, 115, 120, 121], при пересадке органов и тканей [28, 30, 37, 91, 92], на экспериментальных животных (мышах) показан оральный (алиментарный) путь заражения [94], сообщалось о возможности заражения посредством пиявок при гирудотерапии [2]. Не исключена вероятность полового пути заражения.

В Московской области методом ПЦР в образцах крови коров выявлены 5 штаммов тейлерий — *Th. annulata, Th. orientalis, Th. buffeli,*

Th. sergenti и *Th. sinensis* [42], распространенных у животных Африканского континента [95]. В крови лошадей в Сибирском регионе выявили *Th. equi*, с такой же последовательностью в ДНК, как в Китае, Корее, Монголии, Швейцарии, Испании, Бразилии, Индии, США, Европе и Южной Африке [12].

Исследования архивного цитологического материала на *B.* spp. молекулярно-генетическим методом (набор: D-5389 РеалБест ДНК Babesia species (комплект 1) № РЗН 2017/6258) образцов ФР, ПР и МР показали отрицательный результат.

Выводы

1. Исследованиями цитологического материала ФР, ПР и МР ЩЖ человека, окрашенного по Романовскому–Гимзе, в эритроцитах и тироцитах выявлена внутриклеточная кровепаразитарная (гемоспоридийная) инфекция.

2. В мазках, окрашенных по Фельгену, удалось локализовать ядерную ДНК тироцитов и подтвердить наличие ДНК гемоспоридий в виде экзоэритроцитарной, внутриэритроцитарной стадий развития и шизогонии в тироцитах. Внутриклеточное развитие гемоспоридийной инфекции в тироцитах приводит к незавершенности цитокинеза, к выраженной гиперплазии цитоплазмы и ее вакуолизации, к многоядерности и полиморфизму тироцитов, с их деформацией, вакуолизацией и смещением ядер на периферию клетки.

3. Отсутствие литической гибели инфицированных тироцитов в злокачественных образованиях ЩЖ свидетельствует о способности инфекции управлять апоптозом клеток.

4. Изменения цитоскелета тироцитов гемоспоридиями несомненно приводят к нарушениям биохимических и физиологических функций ЩЖ.

5. Хирургическое удаление злокачественной опухоли и применение противоопухолевой химиотерапии при гемоспоридийной инфекции не гарантирует полного выздоровления больного. Возможно последующее рецидивирование опухоли на прежнем месте, или «метастазирование» гемоспоридий в виде интра- и экзоэритроцитарной стадии развития или инфицированных тироцитов по организму гематогенным и лимфогенным путями.

Планируется продолжение молекулярно-генетических исследований цитологического материала для определения вида возбудителя.

Список литературы/References

1. Волченко Н.Н., Славнова Е.Н. Цитологические критерии диагностики рака щитовидной железы // Сибирский онкологический журнал. 2006. № 3 (19). С. 5–7. [Volchenko N.N., Slavnova E.N. Cytological criteria for the diagnosis of thyroid cancer. *Sibirskii onkologicheskii zhurnal = Siberian Journal of Oncology, 2006, no. 3 (19), pp. 5–7. (In Russ.)*]
2. Засухин Д.Н., Дьяконов Л.П., Красильников Е.Н. Систематическое положение токсоплазмид, гемоспоридий и пироплазмид // Ветеринария. 1975. № 2. С. 71–74. [Zasukhin D.N., Dyakonov L.P., Krasilnikov E.N. Systematic position of toxoplasmids, hemosporidias and pyroplasmids. *Veterinariya = Veterinary Medicine, 1975, no. 2, pp. 71–74. (In Russ.)*]
3. Карташов С.Н., Ермаков А.М., Ключников А.Г., Миронова Л.П., Миронова А.А., Ярошенко Н.В., Бойко В.П. Бабезиоз собак: новые экологические, молекулярно-генетические и клинико-лабораторные аспекты // Ветеринария Кубани. 2010. № 5. С. 22–24. [Kartashov S.N., Ermakov A.M., Klyuchnikov A.G., Mironova L.P., Mironova A.A., Yaroshenko N.V., Boyko V.P. Babesiosis of dogs: new ecological, molecular genetic and clinical and laboratory aspects. *Veterinariya Kubani = Veterinary of Kuban, 2010, no. 5, pp. 22–24. (In Russ.)*]
4. Колабский Н.А. О развитии гемоспоридий сем. Piroplasmidae в организме позвоночных животных // Сб. тр. Ленинградского Ветеринарного института. 1954. Вып. XIV. С. 9–24. [Kolabsky N.A. On the development of hemosporidia of the family Piroplasmidae in the body of vertebrates. *Proceedings of Leningrad Veterinary Institute, 1954, iss. XIV, pp. 9–24. (In Russ.)*]
5. Крылов М.В. Пироплазмиды. Л.: Наука, 1981. 230 с. [Krylov M.V. Pyroplasmids. *Leningrad: Nauka, 1981, 230 p. (In Russ.)*]
6. Лабораторная диагностика заболеваний щитовидной железы. Иммунохимические, иммуноцитохимические, молекулярно-генетические исследования, атлас традиционной и жидкостной цитологии, клиническая интерпретация лабораторных данных. Под. ред. В.В. Долгова, И.П. Шабаловой, А.В. Селивановой. М., СПб., Новосибирск, Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2022. 288 с. [Laboratory diagnosis of thyroid diseases. Immunochemical, immunocytochemical, molecular genetic studies, atlas of traditional and liquid cytology, clinical interpretation of laboratory data. Ed. V.V. Dolgova, I.P. Shabalova, A.V. Selivanova. *Moscow, St. Petersburg, Novosibirsk, Tver: Triada Publishing House LLC, 2022. 288 p. (In Russ.)*]
7. Либерман Е.Л., Силиванова Е.А., Георгию Х. Эпизоотология анаплазмоза и бабезиоза северного оленя в Тюменской области // Вестник Тюменского государственного университета. 2012. № 6. С. 25–30. [Liberman E.L., Silivanova E.A., Georgy H. Epizootology of anaplasmosis and babesiosis of reindeer in the Tyumen region. *Vestnik Tyumenskogo gosudarstvennogo universiteta = Bulletin of the Tyumen State University, 2012, no. 6, pp. 25–30. (In Russ.)*]
8. Орлов Н.П. Биологические основы лечения и профилактики паразитарных заболеваний. М.: Сельхозгиз, 1961. 159 с. [Orlov N.P. Biological basis for the treatment and prevention of parasitic diseases. *Moscow: Selkhozgiz, 1961. 159 p. (In Russ.)*]
9. Петров Н.Н. Спорное в учении об этиологии опухолей // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1954. Т. XXXVII. С. 65–72. [Petrov N.N. Controversial in the doctrine of the etiology of tumors. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 1954, vol. XXXVII, pp. 65–72. (In Russ.)*]

10. Полоз Т.Л., Шевченко С.П. Проблемы цитологической диагностики фолликулярных опухолей щитовидной железы // Сибирский онкологический журнал. 2011. № 6 (48). С. 62–65. [Poloz T.L., Shevchenko S.P. Cytological problems diagnostics of follicular tumors of the thyroid gland. *Sibirskii onkologicheskii zhurnal = Siberian Journal of Oncology, 2011, no. 6 (48), pp. 62–65. (In Russ.)*]
11. Поляков В.А. Кровососущие двукрылые насекомые как переносчики патогенных микроорганизмов // Труды ВНИИВС. М., 1973. Т. XLV, С. 273–286. [Polyakov V.A. Blood-sucking Diptera insects as carriers of pathogenic microorganisms. *Proceedings of All-Union Research Institute of Veterinary Sanitation. Moscow, 1973, vol. XLV, pp. 273–286. (In Russ.)*]
12. Рар В.А., Марченко В.А., Ефремова Е.А., Сунцова О.В., Лисак О.В., Тикунов А.Ю., Мельцов И.В., Тикунова Н.В. Идентификация и генетическая характеризация этиологического агента пироплазмидоза лошадей на территории Западной и Восточной Сибири // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018. Т. 22, № 2. С. 224–229. [Rar V.A., Marchenko V.A., Efremova E.A., Suntsova O.V., Lisak O.V., Tikunov A.Yu., Meltsov I.V., Tikunova N.V. Identification and genetic characterization of the etiological agent of piroplasmidosis in horses in Western and Eastern Siberia. *Vavilovskii zhurnal genetiki i selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding, 2018, vol. 22, no. 2, pp. 224–229. (In Russ.)*]. *doi: 10.18699/VJ18.351*
13. Свердлов Е.Д. Взгляд на жизнь через окно генома: В 3 т. М.: Наука, 2009. Т. 2: Очерки современной молекулярной генетики. 2019. 495 с. [Sverdlov E.D. A look at life through the window of the genome: In 3 volumes. *Moscow: Nauka, 2009. Vol. 2: Essays on modern molecular genetics. 2019. 495 p. (In Russ.)*]
14. Симоварт Ю., Пракс Я. Картина крови при лейкозе и бабезиозе крупного рогатого скота // Гематология и лейкозы сельскохозяйственных животных: материалы докл. Всесоюзн. науч.-практ. конф. терапевтов и диагностов, посвященной 100-летию профессора Н.П. Рухлядева. Казань, 1969. Т. 1. С. 105–107. [Simovart Y., Prax Y. Blood picture in leukemia and babesiosis in cattle. Hematology and leukemia of agricultural animals: materials of the reports of the All-Union scientific-practical conference of therapists and diagnosticians, dedicated to the 100th anniversary of Professor N.P. Rukhlyadev. *Kazan, 1969, vol. 1, pp. 105–107. (In Russ.)*]
15. Степанова Н.И., Казаков Н.А., Заблоцкий В.Т., Петровский В.В., Абрамов И.В., Вершинин И.И., Хван М.В., Манжос А.Ф. Протозойные болезни сельскохозяйственных животных. М.: Колос, 1982. 352 с. [Stepanova N.I., Kazakov N.A., Zablotskiy V.T., V.V. Petrovsky, I.V. Abramov, I.I. Vershinin, M.V. Khwan, A.F. Manzhos. Protozoal diseases of farm animals. *Moscow: Kolos, 1982. 352 p. (In Russ.)*]
16. Таурбаева С.Н., Токпан С.С., Шевцов А.Б., Лидер Л.А. Тейлериоз крупного рогатого скота: распространение и диагностика в условиях Кызылординской области // Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С. Сейфулина. Астана, 2017. С. 73–78. [Taurbaeva S.N., Tokpan S.S., Shevtsov A.B., Leader L.A. Cattle Theileriosis: distribution and diagnosis in the conditions of the Kyzylorda region. *Herald of the Kazakh Agro-Technical University. S. Seyfulina. Astana, 2017, pp. 73–78. (In Russ.)*]
17. Терентьев Ф.А., Марков А.А., Полыковский М.Д. Болезни овец. М., 1963. 520 с. [Terentyev F.A., Markov A.A., Polykovsky M.D. Diseases of sheep. *Moscow, 1963. 520 p. (In Russ.)*]
18. Терлецкий А.В., Ахмерова Л.Г., Евтушенко Е.В. Кровепаразитарная инфекция как причина возникновения воспалительных реакций и доброкачественных образований щитовидной железы человека // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 1. С. 155–161. [Terletsky A.V., Akhmerova L.G., Evtushenko E.V. Blood parasite infection causing inflammatory reaction and benign formations in human thyroid gland. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 155–161. (In Russ.)*]. *doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-155-161*
19. Трофимов И.Т. Протозойные болезни сельскохозяйственных животных (гемоспоридиозы и трипанозомозы). М., 1955. 237 с. [Trofimov I.T. Protozoan diseases of farm animals (hemosporidiosis and trypanosomiasis). *Moscow, 1955. 237 p. (In Russ.)*]
20. Шабад Л.М. Некоторые экспериментальные данные к этиологии и патогенезу опухолей // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. 1954. Т. 74, № 3. С. 3–6. [Shabad L.M. Some experimental data on the etiology and pathogenesis of tumors. *Vestnik khirurgii im. I.I. Grekova = Grekov's Bulletin of Surgery, 1954, vol. 74, no. 3, pp. 6–17. (In Russ.)*]
21. Шабдарбаева Г.С., Абдыбекова А.М., Божбанов Б. Выявление очагов кровепаразитарных болезней жвачных животных на юге Казахстана // Евразийский союз ученых. 2016. № 12–2 (33). С. 17–21. [Shabdarbaeva G.S., Abdybekova A.M., Bozhbanov B. Detection of foci of blood parasitic diseases of ruminants in the south of Kazakhstan. *Evraziiskii soyuz uchenykh = Eurasian Union of Scientists, 2016, no. 12–2 (33), pp. 17–21. (In Russ.)*]
22. Шкурупий В.А., Полоз Т.Л. Цитоморфология фолликулярных опухолей щитовидной железы. Дифференциальная диагностика методом компьютерного анализа изображений и нейросетевых технологий. Новосибирск: Наука, 2009. 190 с. [Shkurupy V.A., Poloz T.L. Cytomorphology of thyroid follicular tumors. Differentiated diagnostics using the method of computerized image analysis and neuronetwork technologies. *Novosibirsk: Nauka, 2009. 190 p. (In Russ.)*]
23. Abittan B., Nizam A., Oey M., Callan F., Simmonds L., Pachtman S. A case of babesiosis in a pregnant patient treated with red blood cell exchange transfusion. *Case Rep. Obstet. Gynecol., 2019, vol. 2019: 9869323. doi: 10.1155/2019/9869323*
24. Aderinboye O., Syed S. Congenital babesiosis in a four-week-old female infant. *Pediatr. Infect. Dis. J., 2010, vol. 29, no. 2: 188. doi: 10.1097/INF.0b013e3181c3c971*
25. Ahmed J.S., Hauschild S., Schein E. The role of interleukin 2 (IL 2) in the proliferation of Theileria annulata-infected bovine lymphocytes. *Parasitol. Res., 1987, vol. 73, no. 6, pp. 524–526. doi: 10.1007/bf00535327*
26. Ahmed J., Schnittger L., Mehlhorn H. Review: Theileria schizonts induce fundamental alterations in their host cells. *Parasitol. Res., 1999, vol. 85, no. 7, pp. 527–538. doi: 10.1007/s004360050592*
27. Allred D.R. Antigenic variation in babesiosis: is there more than one 'why'? *Microbes Infect., 2001, vol. 3, pp. 481–491. doi: 10.1016/S1286-4579(01)01404-6*
28. Ather I., Pourafshar N., Schain D., Gupte A., Casey M. Babesiosis: An unusual cause of sepsis after kidney transplantation and review of the literature. *Transpl. Infect. Dis., 2017, vol. 19, no. 5: e12740. doi: 10.1111/tid.12740*

29. Auerbach M., Haubenstock A., Soloman G. Systemic babesiosis. Another cause of the hemophagocytic syndrome. *Am. J. Med., 1986, vol. 80, pp. 301–303. doi: 10.1016/0002-9343(86)90028-8*
30. Bade N.A., Yared J.A. Unexpected babesiosis in a patient with worsening anemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood, 2016, vol. 128, no. 7: 1019. doi: 10.1182/blood-2016-05-717900*
31. Baneth G., Florin-Christensen M., Cardoso L., Schnittger L. Reclassification of Theileria anna as Babesia vulpes sp. nov. *Parasites & Vectors, 2015, vol. 8: 207. doi: 10.1186/s13071-015-0830-5*
32. Barry M., Bleackley R. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat. Rev. Immunol., 2002, vol. 2, no. 6, pp. 401–409. doi: 10.1038/nri819*
33. Baylin S.B., Herman J.G. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet., 2000, vol. 16, no. 4, pp. 168–174. doi: 10.1016/s0168-9525(99)01971-x*
34. Bierne H., Cossart P. When bacteria a target the nucleus: the emerging family of nucleomodulins. *Cell Microbiol., 2012, vol. 14, no. 5, pp. 622–633. doi: 10.1111/j.1462-5822.2012.01758.x*
35. Bierne H., Hamon M., Cossart P. Epigenetics and bacterial infections. *Cold Spring Harb. Perspect. Med., 2012, vol. 2, no. 12: a010272. doi: 10.1101/cshperspect.a010272*
36. Brahimi-Horn M., Chiche J., Pouysségur J. Hypoxia and cancer. *J. Mol. Med., 2007, vol. 85, no. 12, pp. 1301–1307. doi: 10.1007/s00109-007-0281-3*
37. Brennan M.B., Herwaldt B.L., Kazmierczak J.J., Weiss J.W., Klein C.L., Leith C.P., He R., Oberley M.J., Tonnetti L., Wilkins P.P., Gauthier G.M. Transmission of Babesia microti parasites by solid organ transplantation. *Emerg. Infect. Dis., 2016, vol. 22, no. 11, pp. 1869–1876. doi: 10.3201/eid2211.151028*
38. Brown W.C. Molecular approaches to elucidating innate and acquired immune responses to Babesia bovis a protozoan parasite that causes persistent infection. *Vet. Parasitol., 2001, vol. 101, no. 3–4, pp. 233–248. doi: 10.1016 / s0304-4017 (01) 00569-6*
39. Brown W.C., Norimine J., Knowles D.P., Goff W.L. Immune control of Babesia bovis infection. *Vet. Parasitol., 2006, vol. 138, no. 1–2, pp. 75–87. doi: 10.1016 / j.vetpar.2006.01.041*
40. Boulouis H.-J., Chang C.-C., Henn J.B., Kasten R.W., Chomel B.B. Factors associated with the rapid emergence of zoonotic Bartonella infections. *Vet. Res., 2005, vol. 36, no. 3, pp. 383–410. doi: 10.1051/vetres:2005009*
41. Boustani M.R., Lepore T.J., Gelfand J.A., Lazarus O.S. Acute respiratory failure in patients treated for babesiosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1994, vol. 149, no. 6, pp. 1689–1691. doi: 10.1164/ajrccm.149.6.8004331*
42. Bursakov S.A., Kovalchuk S.N. Co-infection with tick-borne disease agents in cattle in Russia. *Ticks Tick Borne Dis., 2019, no. 10, pp. 709–713. doi: 10.1016/j.ttbdis.2019.03.004*
43. Busseniers H.E., Oertel Y.C. "Cellular adenomatoid nodules" of the thyroid: review of 219 fine-needle aspirates. *Diagn. Cytopathol., 1993, vol. 9, no. 5, pp. 581–589. doi: 10.1002/dc.2840090523*
44. Cairns R.A., Harris I.S., Mak T.W. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer, 2011, vol. 11, no. 2, pp. 85–95. doi: 10.1038/nrc2981*
45. Campbell J., Brown D., Nichani A., Howie S., Spooner R., Glass E. A non-protective T helper 1 response against the intramacrophage protozoan Theileria annulata. *Clin. Exp. Immunol., 1997, vol. 108, no. 3, pp. 463–470. doi: 10.1046/j.1365-2249.1997.3861290.x*
46. Campbell J.D., Nichani A.K., Brown D.J., Howie S.E., Spooner R.L., Glass E.J. Parasite-mediated steps in immune response failure during primary Theileria annulata infection. *Trop. Anim. Health. Prod., 1997, vol. 29 (4 Suppl.): 133S-135S. doi: 10.1007/BF02632953*
47. Campbel J., Spooner R. Macrophages behaving badly: infected cells and subversion of immune responses to Theileria annulata. *Parasitol. Today, 1999, vol. 15, no. 1, pp. 10–16. doi: 10.1016/s0169-4758(98)01359-3*
48. Certad G., Ngouanesavanh T., Guyot K., Gantois N., Chassat T., Mouray A., Fleurisse L., Pinon A., Cailliez J.-C., Dei-Cas E., Creusy C. Cryptosporidium parvum, a potential cause of colic adenocarcinoma. *Infect. Agent Cancer, 2007, vol. 2, no.1: 22. doi: 10.1186/1750-9378-2-22*
49. Chakraborty S., Roy S., Mistry H.U., Murthy S.,George N., Bhandari V., Sharma P. Potential sabotage of host cell physiology by apicomplexan parasites for their survival benefits. *Front. Immunol., 2017, vol. 8: 1261. doi: 10.3389/fimmu.2017.01261*
50. Chaussepied M., Langsley G. Theileria transformation of bovine leukocytes: a parasite model for the study of lymphoproliferation. *Res. Immunol., 1996, vol. 147, no. 3, pp. 127–138. doi: 10.1016/0923-2494(96)83165-8*
51. Cheeseman K.M, Certad G., Weitzman J.B. [Parasites and cancer: is there a causal link?]. *Med. Sci. (Paris), 2016. vol. 32, no. 10, pp. 867–873. doi: 10.1051/medsci/20163210020*
52. Cheeseman K.M., Weitzman J.B. Host-parasite interactions; an intimate epigenetic relationship. *Cell. Microbiol., 2015, vol. 17, no. 8, pp. 1121–1132. doi: 10.1111/cmi.12471*
53. Cheeseman K.M., Weitzman J.B. [What makes a parasite "transforming"? Insights into cancer from the agents of an exotic pathology, Theileria spp.]. *Bull. Soc. Pathol. Exot., 2017, vol. 110, no. 1, pp. 55–60. doi: 10.1007/s13149-017-0551-4*
54. Clark I.A., Budd A.C., Hsue G., Haymore B.R., Joyce A.J., Thorner R., Krause P.J. Absence of erythrocyte sequestration in a case of babesiosis in a splenectomized human patient. *Malar. J., 2006, vol. 5: 69. doi: 10.1186/1475-2875-5-69*
55. Cock-Rada A.M., Medjkane S., Janski N., Yousfi N., Perichon M., Chaussepied M., Chluba J., Langsley G., Weitzman J.B. SMYD3 promotes cancer invasion by epigenetic upregulation of the metalloproteinase MMP-9. *Cancer Res., 2012, vol. 72, no. 3, pp. 810–820. doi: 10.1158 / 0008-5472.CAN-11-1052*
56. Criado-Fornelio A., Martinez-Marcos A., Buling-Saraca A., Barba-Carretero J.C: Molecular studies on Babesia, Theileria and Hepatozoon in southern Europe Part I: Epizootiological aspects. *Vet. Parasitol., 2003, vol. 113, pp. 189–201. doi: 10.1016/s0304-4017(03)00078-5*
57. De Martel C., Ferlay J., Franceschi S., Vignat J., Bray F., Forman D., Plummer M Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol., 2012, vol. 13, no. 6, pp. 607–615. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70137-7*

58. Dessauge F., Hilaly S., Baumgartner M., Blumen B., Werling D., Langsley G. c-Myc activation by Theileria parasites promotes survival of infected B-lymphocytes. *Oncogene, 2005, vol. 24, no. 6, pp. 1075–1083. doi: 10.1038/sj.onc.1208314*
59. Dewhirst M., Cao Y., Moeller B. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat. Rev. Cancer, 2008, vol. 8, no. 6, pp. 425–437. doi: 10.1038/nrc2397*
60. Dobbelaere D., Heussler V. Transformation of leukocytes by Theileria parva and T. annulata. *Annu. Rev. Microbiol., 1999, vol. 53, pp. 1–42. doi: 10.1146/annurev.micro.53.1.1*
61. Dobbelaere D.A., Fernandez P.C., Heussler V.T. Theileria parva: taking control of host cell proliferation and survival mechanisms. *Cell. Microbiol., 2000, vol. 2, no. 2, pp. 91–99. doi: 10.1046 / j.1462-5822.2000.00045.x*
62. Dobroszycki J., Herwaldt B. L, Boctor F., Miller J.R., Linden J., Eberhard M.L., Yoon J.J., Ali N.M., Tanowitz H.B., Graham F., Weiss L.M., Wittner M. A cluster of transfusion-associated babesiosis cases traced to a single asymptomatic donor. *JAMA, 1999, vol. 281, no. 10, pp. 927–930. doi: 10.1001/jama.281.10.927*
63. Dodd R.Y. Transmission of parasites by blood transfusion. *Vox Sang.,1998, vol. 74, no. 2, pp. 161–163. doi: 10.1111/j.1423-0410.1998.tb05415.x.*
64. Dom G., Frank S., Floor S., Kehagias P., Libert F., Hoang C., Andry G., Spinette A., Craciun L., Aubin N.S., Tresallet C., Tissier F., Savagner F., Majjaj S., Gutierrez-Roelens I., Marbaix E., Dumont J., Maenhaut C. Thyroid follicular adenomas and carcinomas: molecular profiling provides evidence for a continuous evolution. *Oncotarget, 2018, vol. 9, no. 12, pp. 10343–10359. doi: 10.18632/oncotarget.23130*
65. Entrican J.H., Williams H., Cook I.A., Lancaster W.M., Clark J.C. Babesiosis in man: a case from Scotland. *Br. Med. J., 1979, vol. 2, no. 6188, pp. 474. doi: 10.1136/bmj.2.6188.474*
66. Feder H.M., Lawlor M., Krause P.J. Babesiosis in pregnancy. *N. Engl. J. Med., 2003, vol. 349, no. 2, pp. 195–196. doi: 10.1056/NEJM200307103490221.*
67. Fox L.M., Wingerter S., Ahmed A., Arnold A., Chou J., Rhein L., Levy O. Neonatal babesiosis: case report and review of the literature. *Pediatr. Infect. Dis. J., 2006, vol. 25, no. 2, pp. 169–173. doi: 10.1097/01.inf.0000195438.09628.b0*
68. Ghossein R. Encapsulated malignant follicular cell-derived thyroid tumors. *Endocr. Pathol., 2010, vol. 21, no. 4, pp. 212–218. doi: 10.1007/s12022-010-9141-8.*
69. Goddeeris B., Morrison W. Techniques for the generation, cloning, and characterization of bovine cytotoxic T cells specific for the protozoan Theileria parva. *J. Tissue Cult. Methods, 1988, vol. 11, no. 2, pp. 101–111. doi: 10.1007/BF01404140*
70. Gogvadze V., Orrenius S., Zhivotovsky B. Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? *Trends Cell. Biol., 2008, vol. 18, no. 4, pp. 165–173. doi: 10.1016 / j.tcb.2008.01.006*
71. Graumann K., Hippe D., Gross U., Lüder C.G. Mammalian apoptotic signalling pathways: multiple targets of protozoan parasites to activate or deactivate host cell death. *Microbes Infect., 2009, vol. 11, no. 13, pp. 1079–1087. doi: 10.1016/j.micinf.2009.08.011*
72. Guergnon J., Dessauge F., Langsley G., Garcia A. Apoptosis of Theileria-infected lymphocytes induced upon parasite death involves activation of caspases 9 and 3. *Biochimie, 2003, vol. 85, no. 8, pp. 771–776. doi: 10.1016/j.biochi.2003.09.013*
73. Haller D., Mackiewicz M., Gerber S., Beyer D., Kullmann B., Schneider I., Ahmed J.S., Seitzer U. Cytoplasmic sequestration of p53 promotes survival in leukocytes transformed by Theileria. *Oncogene, 2010, vol. 29, no. 21, pp. 3079–3086. doi: 10.1038/onc.2010.61*
74. Hanahan D., Weinberg R. The hallmarks of cancer. *Cell, 2000, vol. 100, pp. 57–70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9*
75. Hanahan D., Weinberg R. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell, 2011, vol. 144, no. 5, pp. 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013*
76. Hanif M., Adhami N.A., Ahmed R., Ayinla R., Rahman H., Sanelli-Russo S., Gonzalez A., Fleischman J. Guillain–Barre syndrome following human babesiosis. *Chest, 1999, vol. 116, no. 4: 407S.*
77. Harris A.L. Hypoxia — a key regulatory factor in tumor growth. *Nat. Rev. Cancer, 2002, vol. 2, no.1, pp. 38–47. doi: 10.1038/nrc704*
78. Hausen Z. The search for infectious causes of human cancers: where and why. *Virology, 2009, vol. 392, no. 1, pp. 1–10. doi: 10.1016/j.virol.2009.06.001*
79. Hayashida K., Kajino K., Hattori M., Wallace M., Morrison I., Greene M.I., Sugimoto C. MDM2 regulates a novel form of incomplete neoplastic transformation of Theileria parva infected lymphocytes. *Exp. Mol. Pathol., 2013, vol. 94, no. 1, pp. 228–238. doi: 10.1016/j.yexmp.2012.08.008*
80. Heussler V.T., Rottenberg S., Schwab R., Küenzi P., Fernandez P.C., McKellar S., Shiels B., Chen Z.J., Orth K., Wallach D., Dobbelaere D.A. Hijacking of host cell IKK signalosomes by the transforming parasite Theileria. *Science, 2002, vol. 298, no. 5595, pp. 1033–1036. doi: 10.1126/science.1075462*
81. Huber S., Bär A., Epp S., Schmuckli-Maurer J., Eberhard N., Humbel B., Hemphill A., Woods K. Recruitment of host nuclear pore components to the vicinity of Theileria schizonts. *mSphere, 2020, vol. 5, no. 1: e00709–19. doi: 10.1128/mSphere.00709-19*
82. Irwin P.J. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasit Vectors, 2009, vol. 2, suppl. 1: S4. doi: 10.1186/1756-3305-2-S1-S4*
83. Jensen K., Makins G.D., Kaliszewska A., Hulme M.J., Paxton E., Glass E.J. The protozoan parasite Theileria annulata alters the differentiation state of the infected macrophage and suppresses musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene (MAF) transcription factors. *Int. J. Parasitol, 2009, vol. 39, no. 10, pp. 1099–1108. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.02.020*
84. Joseph J.T., Purtill K., Wong S.J., Munoz J., Teal A., Madison-Antenucci S., Horowitz H.W., Aguero-Rosenfeld M.E., Moore J.M., Abramowsky C., Wormser G.P. Vertical transmission of Babesia microti, United States. *Emerg. Infect. Dis., 2012, vol. 18, no. 8, pp. 1318–1321. doi: 10.3201/eid1808.110988*
85. Kinnaird J.H., Weir W., Durrani Z., Pillai S.S., Baird M., Shiels B.R. A bovine lymphosarcoma cell line infected with Theileria annulata exhibits an irreversible reconfiguration of host cell gene expression. *PLoS One, 2013, vol. 8, no. 6: e66833. doi: 10.1371/journal.pone.0066833*

86. Koike T., Kimura N., Miyazaki K., Yabuta T., Kumamoto K., Takenoshita S., Chen J., Kobayashi M., Hosokawa M., Taniguchi A., Kojima T., Ishida N., Kawakita M., Yamamoto H., Takematsu H., Suzuki A., Kozutsumi Y., Kannagi R. Hypoxia induces adhesion molecules on cancer cells: a missing link between Warburg effect and induction of selectin-ligand carbohydrates. *Proc. Natl Acad. Sci. USA, 2004, vol. 101, no. 21, pp. 8132–8137. doi: 10.1073/pnas.0402088101*
87. Kuenzi P., Schneider P., Dobbelaere D.A. Theileria parva-transformed T cells show enhanced resistance to Fas/Fas ligand-induced apoptosis Theileria parva-transformed T cells show enhanced resistance to Fas/Fas ligand-induced apoptosis. *J. Immunol., 2003, vol. 171, no. 3, pp. 1224–1231. doi: 10.4049/jimmunol.171.3.1224*
88. Leiriao P., Rodrigues C.D., Albuquerque S.S., Mota M.M. Survival of protozoan intracellular parasites in host cells. *EMBO Rep., 2004, vol. 5, no. 12, pp. 1142–1147. doi: 10.1038/sj.embor.7400299*
89. Lemercier C. Les infections bactériennes vues du génome eukaryote. *Med. Sci. (Paris), 2014, vol. 30, no. 8–9, pp. 758–764. doi: 10.1051/medsci/20143008013*
90. Lengauer C., Kinzler K.W., Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature, 1998, vol. 396, no. 6712, pp. 643–649. doi: 10.1038/25292.*
91. Lubin A.S., Snydman D.R., Miller K.B. Persistent babesiosis in a stem cell transplant recipient. *Leuk. Res., 2011, vol. 35, no. 6: e77–78. doi: 10.1016/j.leukres.2010.11.029*
92. Lux J., Weiss D., Linden J., Kessler D., Herwaldt B., Wong S., Keithly J., Della-Latta P., Scully B. Transfusion-associated babesiosis after heart transplant. *Emerg. Infect. Dis., 2003, vol. 9, no. 1, pp. 116–119. doi: 10.3201/eid0901.020149*
93. Ma M., Baumgartner M. Intracellular Theileria annulata promote invasive cell motility through kinase regulation of the host actin cytoskeleton. *PLoS Pathog., 2014, vol. 10, no. 3: e1004003. doi: 10.1371/journal.ppat.1004003*
94. Malagon F., Tapia J.L. Experimental transmission of Babesia microti infection by the oral route. *Parasitol. Res., 1994, vol. 80, no. 8, pp. 645–648. doi: 10.1007/BF00932947.*
95. Mans B.J., Pienaar R., Latif A.A. A review of Theileria diagnostics and epidemiology. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl., 2015, no. 4, pp. 104–118. doi: 10.1016/j.ijppaw.2014.12.006*
96. Marnett L.J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res., 1999, vol. 424, no. 1–2, pp. 83–95. doi: 10.1016/s0027-5107(99)00010-x.*
97. Marnett L.J. Chemistry and biology of DNA damage by malondialdehyde. *IARC Sci. Publ., 1999, vol. 150, pp. 17–27.*
98. Marsolier J., Perichon M., DeBarry J.D., Villoutreix B.O., Chluba J., Lopez T., Garrido C., Zhou X.Z., Lu K.P., Fritsch L., Ait-Si-Ali S., Mhadhbi M., Medjkane S., Weitzman J.B. Theileria parasites secrete a prolyl isomerase to maintain host leukocyte transformation. *Nature, 2015, vol. 520, no. 7547, pp. 378–382. doi: 10.1038/nature14044*
99. Marsolier J., Pineau S., Medjkane S., Perichon M., Yin Q., Flemington E., Weitzman M., Weitzman J. OncomiR addiction is generated by a miR-155 feedback loop in theileria-transformed leukocytes. *PLoS Pathog., 2013, vol. 9, no. 4: e1003222. doi: 10.1371/journal.ppat.1003222*
100. Masuda M., Otsuka Yamasaki Y., Shiranaga N., Iguchi A., Uchida N., Sato R., Yamasaki M. Retrospective study on intercurrent pancreatitis with babesia gibsoni infection in dogs. *J. Vet. Med. Sci., 2019, vol. 81, no. 11, pp. 1558–1563. doi: 10.1292/jvms.19-0280*
101. Mathupala S.P., Ko Y.H., Pedersen P.L. The pivotal roles of mitochondria in cancer: Warburg and beyond and encouraging prospects for effective therapies. *Biochim. Biophys. Acta, 2010, vol. 1797, no. 6–7, pp. 1225–1230. doi: 10.1016/j.bbabio.2010.03.025*
102. Matjila P.T., Leisewitz A.L., Ooshuizen M.C., Jongejan F., Penzhorn B. Detection of a Theileria species in dogs in South Africa. *Vet. Parasitol., 2008, vol. 157, no. 1–2, pp. 34–40. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.06.025*
103. McHenry C.R., Phitayakorn R. Follicular adenoma and carcinoma of the thyroid gland. *Oncologist, 2011, vol. 16, no. 5, pp. 585–593. doi: 10.1634/theoncologist.2010-0405*
104. McKeever D.J., Nyanjui J.K., Ballingall K.T. In vitro infection with Theileria parva is associated with IL10 expression in all bovine lymphocyte lineages. *Parasite Immunol., 1997, vol. 19, no. 7, pp. 319–324. doi: 10.1046/j.1365-3024.1997.d01-214.x*
105. Medjkane S., Perichon M., Marsolier J., Dairou J., Weitzman J.B. Theileria induce oxidative stress and HIF1α activation that are essential for host leukocyte transformation. *Oncogene, 2014, vol. 33, no. 14, pp. 1809–1817. doi: 10.1038/onc. 2013.134.*
106. Medjkane S., Weitzman J.B. A reversible Warburg effect is induced by Theileria parasites to transform host leukocytes. *Cell Cycle, 2013, vol. 12, no. 14, pp. 2167–2168. doi: 10.4161/cc.25540*
107. Mehlhorn H., Schein E. The piroplasms: "A long story in short" or "Robert Koch has seen it". *Eur. J. Protistol., 1993, vol. 29, no. 3, pp. 279–293. doi: 10.1016/S0932-4739(11)80371-8*
108. Mehlhorn H., Schein E. Redescription of Babesia equi Laveran, 1901 as Theileria equi Mehlhorn, Schein 1998. *Parasitol. Res., 1998, vol. 84, no. 6, pp. 467–475. doi: 10.1007/s004360050431*
109. Mesri E.A., Feitelson M., Munger K. Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis. *Cell Host Microbe, 2014, vol. 15, no. 3, pp. 266–282. doi: 10.1016/j.chom.2014.02.011*
110. Metheni M., Echebli N., Chaussepied M., Ransy C., Chereau C., Jensen K., Glass E., Batteux F., Bouillaud F., Langsley G. The level of H2O2-type oxidative stress regulates virulence of Theileria-transformed leukocytes. *Cell. Microbiol., 2014, vol. 16, no. 2, p. 269–279. doi: 10.1111/cmi.12218*
111. Metheni M., Lombes A., Bouillaud F., Batteux F., Langsley G. HIF-1α induction, proliferation and glycolysis of Theileria-infected leukocytes. *Cell Microbiol., 2015, vol. 17, no. 4, pp. 467–472. doi: 10.1111/cmi.12421*
112. Mohr A.J., Lobetti R.G., van der Lugt J.J. Acute pancreatitis: a newly recognised potential complication of canine babesiosis. *J. S. Afr. Vet. Assoc., 2000, vol. 71, no. 4, pp. 232–239. doi: 10.4102/jsava.v71i4.721*
113. Murase T., Ueda T., Yamato O., Tajima M., Maede Y. Oxidative damage and enhanced erythrophagocytosis in canine erythrocytes infected with Babesia gibsoni. *J. Vet. Med. Sci., 1996, vol. 58, no. 3, pp. 259–261. doi: 10.1292/jvms.58.259*
114. Nakamura K., Yokoyama N., Igarashi I. Cyclin-dependent kinase inhibitors block erythrocyte invasion and intraerythrocytic development of Babesia bovis in vitro. *Parasitology, 2007, vol. 134, no. 10, pp. 1347–53. doi: 10.1017/S0031182007002831*
115. New D.L., Quinn J.B., Quresbi M.Z., Sigler S.J. Vertically transmitted babesiosis. *J. Pediatrics, 1997, vol. 131, no. 1 (Pt. 1), pp. 163–164. doi: 10.1016/s0022-3476(97)70143-4*

116. O'Connor R.M., Allred D.R. Selection of Babesia bovis-infected erythrocytes for adhesion to endothelial cells coselects for altered variant erythrocyte surface antigen isoforms. *J. Immunol., 2000, vol. 164, no. 4, pp. 2037–2045. doi: 10.4049/jimmunol.164.4.2037*
117. Osorno B.M., Vega S., Ristic M., Robles C., Ibarra S. Isolation of Babesia spp. from asymptomatic human beings. *Vet. Parasitol., 1976, vol. 2, no. 1, pp. 111–120. doi: 10.1016/0304-4017(76)90057-1*
118. Pedersen P.L. Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen. *J. Bioenerg. Biomembr., 2007, vol. 39, no. 3, pp. 211–222. doi: 10.1007/s10863-007-9094-x*
119. Ramos-Vara J.A., Miller M.A., Johnson G.C., Pace L.W. Immunohistochemical detection of thyroid transcription factor-1, thyroglobulin, and calcitonin in canine normal, hyperplastic, and neoplastic thyroid gland. *Vet. Pathol., 2002, vol. 39, no. 4, pp. 480–487. doi: 10.1354/vp.39-4-480*
120. Raucher H.S., Jaffin H., Glass J.L. Babesiosis in Pregnancy. *Obstetrics & Gynecology, 1984, vol. 63, no. 3, pp. 7S-9S.*
121. Rech A., Bittar C.M., Castro C.G. Jr., Azevedo K.R., Santos R.P., Machado A.R.L., Schwartsmann G., Goldani L., Brunetto A.L. Asymptomatic babesiosis in a child with hepatoblastoma. *J. Pediatr. Hematol. Oncol., 2004, vol. 26, no. 3: 213. doi: 10.1097/00043426-200403000-00015*
122. Robertson K.D. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene, 2001, vol. 20, no. 24, pp. 3139–3155. doi: 10.1038/sj.onc.1204341*
123. Rolando M., Sanulli S., Rusniok C., Gomez-Valero L., Bertholet C., Sahr T., Margueron R., Buchrieser C. Legionella pneumophila effector RomA uniquely modifies host chromatin to repress gene expression and promote intracellular bacterial replication. *Cell. Host. Microbe, 2013, vol. 13, no. 4, pp. 395–405. doi: 10.1016/j.chom.2013.03.004*
124. Rorive S., Eddafali B., Fernandez S., Decaestecker C., André S., Kaltner H., Kuwabara I., Liu F.T., Gabius H.J., Kiss R., Salmon I. Changes in galectin-7 and cytokeratin-19 expression during the progression of malignancy in thyroid tumors: diagnostic and biological implications. *Mod. Pathol., 2002, vol. 15, no. 12, pp. 1294–1301. doi: 10.1097/01.MP.0000037306.19083.28*
125. Sauter C., Kurrer M.O. Intracellular bacteria in Hodgkin's disease and sclerosing mediastinal B-cell lymphoma: sign of a bacterial etiology? *Swiss Med. Wkly, 2002, vol. 132, no. 23–24, pp. 312–315.*
126. Schoeman J.P., Rees P., Herrtage M.E. Endocrine predictors of mortality in canine babesiosis caused by Babesia canis rossi. *Vet. Parasitol., 2007, vol. 148, no. 2, pp. 75–82. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.06.010*
127. Semenza G.L. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene, 2010, vol. 29, no. 5, pp. 625–634. doi: 10.1038/onc.2009.441*
128. Semenza G.L. Oxygen homeostasis. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med., 2010, vol. 2, no. 3, pp. 336–361. doi: 10.1002/wsbm.69*
129. Shiels B., Langsley G., Weir W., Pain A., McKellar S., Dobbelaere D. Alteration of host cell phenotype by Theileria annulata and Theileria parva: mining for manipulators in the parasite genomes. *Int. J. Parasitol., 2006, vol. 36, no. 1, pp. 9–21. doi: 10.1016/j.ijpara.2005.09.002*
130. Shiels B.R., McKellar S., Katzer F., Lyons K., Kinnaird J., Ward C., Wastling J.M., Swan D. A Theileria annulata DNA binding protein localized to the host cell nucleus alters the phenotype of a bovine macrophage cell line. *Eukaryot. Cell, 2004, vol. 3, no. 2, pp. 495–505. doi: 10.1128/EC.3.2.495-505.2004*
131. Sivakumar T., Hayashida K., Sugimoto C., Yokoyama N. Evolution and genetic diversity of Theileria. *Infect. Genet. Evol., 2014, vol. 27, pp. 250–263. doi: 10.1016/j.meegid.2014.07.013*
132. Snyder E.L., Dodd R.Y. Reducing the risk of blood transfusion. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program., 2001, vol. 2001, no. 1, pp. 433–442. doi: 10.1182/asheducation-2001.1.433*
133. Spooner R.L., Innes E.A., Glass E.J., Brown C.G. Theileria annulata and T. parva infect and transform different bovine mononuclear cells. *Immunology, 1989, vol. 66, no. 2, pp. 284–288.*
134. Sulżyc-Bielicka V., Kołodziejczyk L., Jaczewska S., Bielicki D., Kładny J., Safranow K. Prevalence of Cryptosporidium sp. in patients with colorectal cancer. *Pol. Przegl. Chir., 2012, vol. 84, no. 7, pp. 348–351. doi: 10.2478/v10035-012-0058-4*
135. Sulzyc-Bielicka V., Kuźna-Grygiel W., Kołodziejczyk L., Bielicki D., Kładny J., Stepień-Korzonek M., Telatyńska-Smieszek B. Cryptosporidiosis in patients with colorectal cancer. *J. Parasitol., 2007; vol. 93, no. 3, pp. 722–724. doi: 10.1645/GE-1025R1.1*
136. Swan D.G., Phillips K., Tait A., Shiels B.R. Evidence for localisation of a Theileria parasite AT hook DNA-binding protein to the nucleus of immortalised bovine host cells. *Mol. Biochem. Parasitol., 1999, vol. 101, no. 1–2, pp. 117–129. doi: 10.1016/S0166-6851(99)00064-X*
137. Swan D.G., Stern R., McKellar S., Phillips K., Oura C.A., Karagenc T.I., Stadler L., Shiels B.R. Characterisation of a cluster of genes encoding Theileria annulata AT hook DNA-binding proteins and evidence for localisation to the host cell nucleus. *J. Cell Sci., 2001, vol. 114, no. 15, pp. 2747–2754. doi: 10.1242/jcs.114.15.2747*
138. Tili E., Michaille J.-J., Wernicke D., Alder H., Costinean S., Volinia S., Croce C.M. Mutator activity induced by microRNA-155 (miR-155) links inflammation and cancer. *Proc. Natl Acad. Sci. USA, 2011, vol. 108, no. 12, pp. 4908–4913. doi: 10.1073/pnas.1101795108*
139. Tretina K., Gotia H.T., Mann D.J., Silva J.C. Theileria-transformed bovine leukocytes have cancer hallmarks. *Trends Parasitol., 2015, vol. 31, no. 7, pp. 306–314. doi: 10.1016/j.pt.2015.04.001*
140. Upadhyay M., Samal J., Kandpal M., Singh V., Vivekanandan P. The Warburg effect: insights from the past decade. *Pharmacol. Ther., 2013, vol. 137, no. 3, pp. 318–330. doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.11.003*
141. Vittecoq M., Elguero E., Lafferty K.D., Roche B., Brodeur J., Gauthier-Clerc M., Missé D., Thomas F. Brain cancer mortality rates increase with Toxoplasma gondii seroprevalence in France. *Infect. Genet. Evol., 2012, vol. 12, no. 2, pp. 496–498. doi: 10.1016/j.meegid.2012.01.013*
142. Weinberg F., Hamanaka R., Wheaton W.W., Weinberg S., Joseph J., Lopez M., Kalyanaraman B., Mutlu G.M., Budinger G.R., Chandel N.S. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA, 2010, vol. 107, no. 19, pp. 8788–8793. doi: 10.1073/pnas.1003428107*

143. Weitzman M.D., Weitzman J.B. What's the damage? The impact of pathogens on pathways that maintain host genome integrity. *Cell Host Microbe, 2014, vol. 15, no. 3, pp. 283–294. doi: 10.1016/j.chom.2014.02.010*
144. Wroblewski L.E., Peek R.M., Wilson K.T. Helicobacter pylori and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin. Microbiol. Rev., 2010, vol. 23, no. 4, pp. 713–739. doi: 10.1128/CMR.00011-10*
145. Wulansari R., Wijaya A., Ano H., Horii Y., Nasu T.,Yamane S., Makimura S. Clindamycin in the treatment of Babesia gibsoni infections in dogs. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc., 2003, vol. 39, no. 6, pp. 558–562. doi: 10,5326/0390558*
146. Zheng Y., Cai X., Bradley J.E. microRNAs in parasites and parasite infection. *RNA Biol., 2013, vol. 10, no. 3, pp. 371–379. doi: 10.4161/rna.23716*

Авторы:
Терлецкий А.В., к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск, Россия;
Ахмерова Л.Г., к.б.н., ученый секретарь Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск, Россия.

Authors:
Terletsky A.V., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Molecular Genetics, Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation;
Akhmerova L.G., PhD (Biology), Scientific Secretary, Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 16.05.2022
Отправлена на доработку 31.07.2022
Принята к печати 12.03.2023

Received 16.05.2022
Revision received 31.07.2022
Accepted 12.03.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 2, pp. 275–288

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 2, с. 275–288

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НИЖЕГОРОДСКИХ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ЭПШТЕЙНА–БАРР У ДЕТЕЙ ПРИ ИНФЕКЦИОННОМ МОНОНУКЛЕОЗЕ И ЗДОРОВОМ ВИРУСОНОСИТЕЛЬСТВЕ

М.И. Попкова[1], О.В. Уткин[1], Д.А. Брызгалова[1], Н.А. Сахарнов[1], Е.А. Соболева[2], Е.А. Кулова[3]

[1] *ФБУН Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия*
[2] *ГБУЗ НО Нижегородский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, Нижний Новгород, Россия*
[3] *ООО «Тонус Кроха и Семейная Стоматология», Нижний Новгород, Россия*

Резюме. Многочисленные зарубежные исследования свидетельствуют о выраженной гетерогенности популяции вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ), циркулирующего во всем мире. Предложены разные классификации ВЭБ. Внимание российских исследователей сконцентрировалось на изучении структурно-функционального полиморфизма онкогена *LMP-1* ВЭБ в контексте онкологических заболеваний у взрослых лиц. Целью работы явилась оценка молекулярно-генетического разнообразия ВЭБ у детей с ВЭБ-инфекцией в Нижегородском регионе. Материалом исследования послужили лейкоциты крови и слюна детей в возрасте 1–17 лет с ВЭБ-инфекционным мононуклеозом (n = 69) и здоровых вирусоносителей сопоставимого пола и возраста (n = 32). Всего исследовано 178 изолятов ВЭБ. Для дифференциальной детекции ВЭБ-1/ВЭБ-2 в работе применялся оптимизированный однораундовый вариант ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле. Определение нуклеотидных последовательностей С-концевого фрагмента гена *LMP-1* выполнено методом секвенирования по Сэнгеру. Биоинформационный анализ данных проводили с помощью программного обеспечения MEGA X. В результате при ВЭБ-инфекционном мононуклеозе у всех детей был выявлен только тип ВЭБ-1, среди здоровых вирусоносителей ВЭБ-1 (93,8±4,3%) и ВЭБ-2 (6,2±4,3%). На основе классификации ВЭБ по R.H. Edwards и соавт. определена штаммовая принадлежность изолятов ВЭБ. Всего выявлено пять вариантов *LMP-1*, а именно *B95-8, China 1, Med–, NC* и *Alaskan*, среди которых доминировал *B95-8*. Варианты *LMP-1 Med+, China 2* и *China 3* не были обнаружены ни в одном из исследованных образцов. Показано, что область тандемных повторов вносит существенный вклад в генетическое разнообразие популяции ВЭБ. Суммарно выявлено 100 аминокислотных замен, из которых наиболее распространенными в нижегородских изолятах ВЭБ являются G212S, S366T, E328Q и S309N. Сравнительный анализ показал, что штаммы, делеции, повторы, аминокислотные замены в изолятах ВЭБ из биологических образцов у детей с инфекционным мононуклеозом имели общие характеристики с группой здоровых виру-

Адрес для переписки:
Попкова Мария Игоревна
603950, Россия, Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71, ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (831) 469-79-46 (раб.), 8 906 352-60-15 (моб.).
Факс: 8 (831) 469-79-20. E-mail: popmarig@mail.ru

Contacts:
Mariia I. Popkova
603950, Russian Federation, Nizhny Novgorod, Malaya Yamskaya str., 71, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology.
Phone: +7 (831) 469-79-46 (office), +7 906 352-60-15 (mobile).
Fax: +7 (831) 469-79-20. E-mail: popmarig@mail.ru

Для цитирования:
Попкова М.И., Уткин О.В., Брызгалова Д.А., Сахарнов Н.А., Соболева Е.А., Кулова Е.А. Молекулярно-генетическая характеристика нижегородских изолятов вируса Эпштейна–Барр у детей при инфекционном мононуклеозе и здоровом вирусоносительстве // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 2. С. 275–288. doi: 10.15789/2220-7619-MAG-2056

Citation:
Popkova M.I., Utkin O.V., Bryzgalova D.A., Sakharnov N.A., Soboleva E.A., Kulova E.A. Molecular and genetic characteristics of Nizhny Novgorod region Epstein–Barr virus isolates in children with infectious mononucleosis and healthy virus carriers // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 2, pp. 275–288. doi: 10.15789/2220-7619-MAG-2056

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-MAG-2056

соносителей. При активной форме ВЭБ-инфекции отмечено появление гетерогенных по структуре последовательностей ВЭБ, выделенных из лейкоцитов крови и слюны от одного источника. Таким образом, впервые проведена оценка молекулярно-генетического разнообразия ВЭБ у детей при разных формах ВЭБ-инфекции, что является основой для перспективного развития клинических и эпидемиологических исследований ВЭБ-инфекции на новом методическом уровне.

Ключевые слова: *разнообразие ВЭБ, ВЭБ-1, ВЭБ-2, LMP-1, штаммы, секвенирование, инфекционный мононуклеоз, дети.*

MOLECULAR AND GENETIC CHARACTERISTICS OF NIZHNY NOVGOROD REGION EPSTEIN–BARR VIRUS ISOLATES IN CHILDREN WITH INFECTIOUS MONONUCLEOSIS AND HEALTHY VIRUS CARRIERS

Popkova M.I.[a], Utkin O.V.[a], Bryzgalova D.A.[a], Sakharnov N.A.[a], Soboleva E.A.[b], Kulova E.A.[c]

[a] *Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Nizhniy Novgorod, Russian Federation*

[b] *Nizhny Novgorod Regional Center for the Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases, Nizhny Novgorod, Russian Federation*

[c] *"Tonus Krokha i Semeynaya Stomatologiya" LLC, Nizhniy Novgorod, Russian Federation*

Abstract. Numerous foreign studies evidence about a pronounced heterogeneity of the Epstein-Barr virus (EBV) population circulating throughout the world. Various EBV classifications have been proposed. The attention of Russian researchers has focused on the study of the structural and functional polymorphism of the EBV *LMP-1* oncogene in the context of oncological diseases in adulthood. The aim of the work was to assess EBV molecular genetic diversity in children with EBV infection in the Nizhny Novgorod region. There were analyzed blood leukocyte and saliva specimens from children aged 1–17 years with EBV-infectious mononucleosis (n = 69) and sex- and age-matched healthy virus carriers of (n = 32). A total of 178 EBV isolates were studied. For differential detection of EBV-1/EBV-2, we used an optimized one-round PCR variant with electrophoretic detection of amplification products in agarose gel. Nucleotide sequences of the *LMP-1* gene C-terminal fragment were determined by Sanger sequencing. Bioinformatics data analysis was performed using MEGA X software. As a result, during EBV-infectious mononucleosis, only the EBV-1 type was detected in all children, among healthy virus carriers EBV-1 (93.8±4.3%) and EBV-2 (6.2±4.3%). Based on the EBV classification according to R.H. Edwards et al. the strain affiliation of EBV isolates was determined. A total of five variants of *LMP-1* were identified, namely *B95-8, China 1, Med–, NC* and *Alaskan*, among which *B95-8* dominated. The *LMP-1 Med+, China 2,* and *China 3* variants were not found in any of the studied samples. It has been shown that the region of tandem repeats makes a significant contribution to the genetic diversity of the EBV population. A total of 100 amino acid substitutions were identified, of which the most common in the Nizhny Novgorod region EBV isolates are G212S, S366T, E328Q and S309N. A comparative analysis showed that strains, deletions, repeats, amino acid substitutions in EBV isolates from biological samples in children with infectious mononucleosis had common characteristics with a group of healthy virus carriers. In the active form of EBV infection, the appearance of structurally heterogeneous EBV sequences isolated from blood leukocytes and saliva from a single source was noted. Thus, for the first time, the molecular genetic diversity of EBV in children with various forms of EBV infection was assessed, which is the basis for the prospective development of clinical and epidemiological studies of EBV infection at a new methodological level.

Key words: *EBV diversity, EBV-1, EBV-2, LMP-1, strains, sequencing, infectious mononucleosis, children.*

Введение

Согласно современной таксономии вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) относится к семейству *Herpesviridae*, подсемейству *Gammaherpesvirinae*, роду *Lymphocriptoviruses*, виду *Human gammaherpesvirus 4 (HHV4)*. Первая полногеномная последовательность ВЭБ (прототипный штамм *B95-8*) получена R. Baer и соавт. в 1984 г. (регистрационный номер GenBank: V01555) [14]. Многочисленные зарубежные исследования свидетельствуют о выраженной гетерогенности популяции ВЭБ, циркулирующего во всем мире [2, 10, 12, 13, 16, 17, 23, 24, 31, 33, 37, 40, 41]. Предложено несколько классификаций на основе подхода «гена-кандидата» (*EBNA-2, EBNA-3, EBNA-1, LMP-1, BZLF1, BARF1, BART, EBERs* и др.)[1], широко изучена географическая распространенность отдельных геновариантов ВЭБ [23, 24, 34, 36]. К настоящему времени доказано существование специфических подтипов вируса с высокой онкогенностью при раке носоглотки (РНГ) в эндемичном районе Китая [25, 46]. С 2014 г. по настоящее время в GenBank представлено около 1000 полногеномных последовательностей ВЭБ [17, 42, 46].

[1] Сокращенное обозначение генов ВЭБ приведено согласно данным GenBank. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term = Human+gammaherpesvirus+4

Реаннотирован референсный штамм ВЭБ дикого типа (*RefSeq HHV4*, регистрационный номер GenBank: NC_007605) [30, 36].

В России вопросу изучения генетического разнообразия ВЭБ посвящено ограниченное число публикаций (15 работ за последние 5 лет). Внимание исследователей сконцентрировано на изучении онкогена, кодирующего латентный мембранный белок 1 *(LMP-1)* [1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10]. Для характеристики генетического разнообразия ВЭБ используется преимущественно одна из нескольких классификаций, в основе которых лежит структурно-функциональный полиморфизм гена *LMP-1*. Объектом исследований является исключительно взрослое население в контексте изучения онкологических заболеваний или разных этнических групп. До сих пор ни одна из нуклеотидных последовательностей российских изолятов ВЭБ не была депонирована в базу данных GenBank.

Целью настоящего исследования явилась оценка молекулярно-генетического разнообразия ВЭБ у детей с ВЭБ-инфекцией в Нижегородском регионе.

Материалы и методы

Характеристика групп исследования. Проведен молекулярно-генетический анализ 178 изолятов ВЭБ из лейкоцитов крови и слюны, полученных от 69 детей в возрасте 1–17 (медиана 5 [2; 10]) лет, находившихся на лечении в ГБУЗ НО «Детская инфекционная больница № 8 г. Нижнего Новгорода» с диагнозом «Инфекционный мононуклеоз ВЭБ-этиологии» (группа ВЭБ-ИМ), и 32 ребенка сопоставимого пола и возраста без клинических признаков данного заболевания, проходивших диспансеризацию в ООО «Тонус Кроха и Семейная Стоматология», г. Нижний Новгород (группа ВЭБ-ЗД). Работа выполнена с соблюдением этических требований. Информированное согласие родителей или опекунов на проведение исследовательской работы в соответствии с положениями Хельсинкской декларации (2013) было получено лечащими врачами медицинских организаций. Работа получила одобрение на заседании локального этического комитета ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора (Протокол № 3 от 11.11.2021 г.).

Сбор биологического материала. Материалом для исследования послужила цельная периферическая кровь, стабилизированная К3ЭДТА, и нестимулированная смешанная слюна (далее слюна). В работе использовались остаточные количества образцов цельной крови, полученных для проведения стандартных диагностических исследований в клинической практике. Сбор биоматериала производили однократно: у пациентов с ИМ в первые 3–10 дней от начала клинических проявлений заболевания, а у здоровых волонтеров в день обследования.

Определение ДНК ВЭБ. Для получения фракции лейкоцитов периферической крови использовали реагент «Гемолитик» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Пробоподготовку слюны выполняли оптимизированным нами ранее способом [4]. Выделение тотальной нуклеиновой кислоты проводили с помощью комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия) с модификациями [4, 5]. Выявление и количественное определение ДНК ВЭБ в лейкоцитах крови и слюне выполняли с помощью ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с применением коммерческого набора «АмплиСенс® EBV/CMV/HHV6-скрин-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия) на амплификаторе Rotor-Gene Q 5plex HRM (Qiagen, Германия). Лабораторный протокол на всех этапах ПЦР-РВ соблюдали согласно инструкции производителя.

Дифференциальная детекция ВЭБ-1/ВЭБ-2 методом ПЦР. Для раздельной детекции основных типов ВЭБ (ВЭБ-1 и ВЭБ-2) применен оптимизированный нами ранее вариант однораундовой ПЦР на основе гена EBNA-2 [4, 5].

ПЦР-анализ фрагмента гена LMP-1 ВЭБ. Положительные образцы, содержащие ДНК ВЭБ (по результатам ПЦР-РВ), были использованы для амплификации С-концевого фрагмента гена *LMP-1* вируса методом ПЦР. ПЦР-анализ проводили не в двухраундовой «полугнездовой» ПЦР, описанной в статье M.K. Smatti и соавт. [41], а в однораундовом варианте. При этом использовали праймеры, ранее предназначавшиеся для первого раунда: A1 5′-AGT CAT AGT AGC TTA GCT GAA-3′ и A2 5′-CCA TGG ACA ACG ACA CAG T-3′ [41]. Состав реакционной смеси общим объемом 25 мкл включал следующие реагенты: праймеры (5 пкМ в реакцию) (ДНК-синтез, Россия); 5-кратный Taq Red буфер 12,5 мМ Mg^{2+} (Евроген, Россия); 5 е.а. Taq-F ДНК-полимеразы (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия); смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (до конечной концентрации 0,1 мМ) (Евроген, Россия); деионизированную воду I типа (Milli-Q Integral 3, Франция). В качестве матрицы использовали выделенную ДНК в объеме 5 мкл на реакцию. Условия амплификации: инициация 95°C — 15 мин, 40 циклов (95°C — 5 мин, 53°C — 1 мин, 72°C — 1 мин), финальная элонгация 72°C — 10 мин. Амплификацию специфичных фрагментов проводили на амплификаторе MaxyGene Gradient (Axygen, США). В результате амплифи-

Таблица 1. Распределение вариантов *LMP-1* ВЭБ по группам ВЭБ-ИМ и ВЭБ-ЗД

Table 1. Distribution of EBV *LMP-1* variants by EBV-IM (Infectious Mononucleosis) and EBV-HVC (Healthy Virus Carriers) groups

Группа сравнения Comparison group	Единицы измерения Units	Варианты *LMP-1* ВЭБ по классификации R.H. Edwards и соавт.* EBV *LMP-1* variants according to R.H. Edwards et al. classification*					
		B95-8	*China 1*	*Med–*	*NC*	*Alaskan*	Коинфекция Coinfection
ВЭБ-ИМ EBV-IM (n = 66)	абс./abs.	40	11	3	11	0	1**
	P±σp, %	60,6±6,0	16,7±4,6	4,5±2,5	16,7±4,6	0	1,5±1,5
ВЭБ-ЗД EBV-HVC (n = 31)	абс./abs.	13	3	6	8	1	0
	P±σp, %	41,9±8,9	9,7±5,3	19,4±7,1	25,8±7,9	3,2±3,2	0
Уровень значимости различий p-value		p = 0,085	p = 0,547	p = 0,049	p = 0,291	p = 0,711	p = 0,711

Примечание. *R.H. Edwards и соавт. 1999 [24]; **_China 1_ в лейкоцитах крови и _B95-8_ в слюне.

Note. *R.H. Edwards et al. 1999 [24]; **_China 1_ in blood leukocytes and _B95-8_ in saliva.

цировали фрагмент С-концевой области гена *LMP-1* размером 602 п.н. [41].

Продукты ПЦР-амплификации анализировали с помощью электрофореза в 1,8% агарозном геле, содержащем бромид этидия (0,02% по объему). В качестве стандарта для определения длины двуцепочечных молекул ДНК был использован маркер длин фрагментов (М) «100+ bp DNA Ladder» (Евроген, Россия). Результаты детектировали на трансиллюминаторе InGenius 3 с использованием программного обеспечения GeneSys (Syngene, Великобритания). Полученные данные выражали в качественном формате — обнаружено или не обнаружено.

Секвенирование по Сэнгеру фрагмента гена LMP-1 ВЭБ. Выделение и очистку полученных ампликонов *LMP-1* из агарозного геля проводили с помощью коммерческого набора «ФБиоГель» (Фрактал Био, Россия), в соответствии с инструкцией производителя. Конечный объем элюата составил 30 мкл. Концентрацию очищенной ДНК определяли с помощью спектрофотометра Eppendorf BioPhotometer plus (Eppendorf, Германия). В среднем количество ДНК составляло 150–300 нг на образец.

Для реакции мечения прямой и обратной последовательностей ДНК флуоресцентными терминальными нуклеотидами использовался набор «Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit» (Applied Biosystems, США). Лабораторный протокол на всех этапах анализа соблюдали согласно инструкции производителя. Очистку меченой ДНК *LMP-1* от компонентов реакционной смеси проводили с использованием ацетата натрия (pH = 7,0) и изопропанола. Очищенный фрагмент элюировали в 20 мкл HiDi формамида (Applied Biosystems, США).

Определение нуклеотидных последовательностей ДНК *LMP-1* осуществлялось на генетическом анализаторе AB-3500 genetic analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием оригинального программного обеспечения 3500 Data Collection Software v. 1.0.

Биоинформационный анализ. Биоинформационный анализ данных проводился с помощью открытого программного обеспечения MEGA X (Mega Software, США)[2]. Полученные исходные нуклеотидные последовательности выравнивались по алгоритму ClustalW. В качестве референсных последовательностей служили полученные из базы данных GenBank[3] полногеномные последовательности прототипного штамма *B95-8* (V01555.2) и референсного штамма *HHV4* (NC_007605.1), а также нуклеотидные последовательности гена *LMP-1* — штаммы *China 1* (AY337723.1), *China 2* (AY337724.1), *Med–* (AY337721.2), *Med+* (AY337722.2), *NC* (AY337726.2), *Alaskan* (AY337725.1) и *CAO* (X58140.1). Нуклеотидные последовательности исследуемых изолятов ВЭБ и референтов транслировались в аминокислотные последовательности по стандартному генетическому коду. Построение филогенетических деревьев выполнено на основе метода максимального правдоподобия (Maximum likelihood). Принадлежность исследуемых последовательностей *LMP-1* к определенным вариантам в рамках классификации R.H. Edwards и соавт. [24] устанавливалась по наличию сигнатурных аминокислотных замен (согласно табл. 1 в [24]).

Полученные нуклеотидные последовательности нижегородских изолятов ВЭБ депонированы в базе данных GenBank/NCBI от 09.08.2022 г. под регистрационными номерами OP105219–OP105376.

[2] URL: https://www.megasoftware.net

[3] URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank

Статистическая обработка данных. Статистический анализ выполнен на основе языка программирования R версия 4.0.0 (The R Foundation for Statistical Computing, Inc)[4] и среды RStudio версия 1.4.1106 (RStudio, PBC)[5]. При оценке распространенности ВЭБ-1/ВЭБ-2 и геновариантов *LMP-1* совпадающие результаты исследования изолятов ВЭБ, выделенных одновременно из лейкоцитов крови и слюны от одного источника вируса, из анализа исключались. Частоту показателя (долю) описывали с указанием стандартного отклонения процентной доли ($P \pm \sigma_p$) в %. Оценку различий относительных показателей в анализируемых группах проводили с применением критерия χ^2 (хи-квадрат) с поправкой Йетса и критерия Фишера. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Оценка распространенности ВЭБ-1 и ВЭБ-2. По результатам ПЦР-анализа клинических изолятов ВЭБ тип вируса был идентифицирован у всех детей. При этом в группе ВЭБ-ИМ как в лейкоцитах крови, так и в слюне выявлялся только ВЭБ-1. В группе ВЭБ-ЗД доминирующим типом вируса также являлся ВЭБ-1 (93,8±4,3% (30/32)). Только у двух детей в лейкоцитах крови обнаружен ВЭБ-2, что составило 6,2±4,3% от общего числа здоровых вирусоносителей. Случаев коинфекции двумя типами вируса не выявлено.

Оценка молекулярно-генетического разнообразия ВЭБ на основе метода секвенирования по Сэнгеру С-концевого фрагмента гена LMP-1. Предварительно проведенный сравнительный анализ нуклеотидных и транслированных аминокислотных последовательностей двух референсных штаммов ВЭБ из базы данных GenBank — *B95-8* (V01555.2) и *RefSeq HHV4* (NC_007605.1) показал, что они являются идентичными друг другу в координатах нуклеотидной последовательности анализируемого нами участка гена *LMP-1* (168258–168320), что соответствует положению аминокислот 187–386 в белке *LMP-1*.

Дальнейшее субтипирование ВЭБ в нижегородских изолятах осуществлено на основе метода секвенирования по Сэнгеру самого вариабельного участка генома ВЭБ, а именно фрагмента С-концевой области гена *LMP-1*. Из 178 изолятов ВЭБ было секвенировано 165 нуклеотидных последовательностей. Последующий анализ полученных аминокислотных последовательностей нижегородских изолятов ВЭБ проводили по нескольким направлениям: 1) дифференциальный анализ вариантов *LMP-1* ВЭБ на основе классификации R.H. Edwards и соавт. [24]; 2) поиск делеций и вставок; 3) характеристика тандемных повторов; 4) аминокислотные замены.

В результате на основе общеизвестной и широко используемой классификации ВЭБ по R.H. Edwards и соавт. [24] дана оценка штаммовой принадлежности нижегородских изолятов ВЭБ. По итогам филогенетического анализа сформировались 5 клад, которые представляют 5 из 7 известных штаммов вируса, а именно *B95-8*, *China 1*, *Med*, *NC* и *Alaskan* (рис. 1). Отметим, что вариант *LMP-1 Med* был представлен исключительно *Med–* (не содержащий САО-подобную делецию 30 н.о./10 а.к.). Варианты *LMP-1 Med+*, *China 2* и *China 3* не были идентифицированы ни в одном из нижегородских изолятов ВЭБ. Для подтверждения филогенетической группировки проверены сигнатурные аминокислотные замены, определенные авторами классификации в семи основных локусах *LMP-1* ВЭБ в позициях 229, 306, 312, 322, 334, 338, 344. При удалении локуса 344 и повторении анализа, как ранее было описано [24], дискриминация между штаммами сохранялась.

Данные табл. 1 демонстрируют, что какого-то конкретного штамма *LMP-1* ВЭБ, ассоциированного с ВЭБ-ИМ у детей, не существует. Однако доминирующее положение в нижегородских изолятах ВЭБ занял вариант *LMP-1 B95-8*, что отмечалось как при активной, так и латентной форме ВЭБ-инфекции. При сравнительной оценке в группе ВЭБ-ИМ варианты *B95-8* и *China 1* были выявлены в 1,4 и 1,7 раза чаще, чем в группе ВЭБ-ЗД (различия статистически незначимы), а вариант *Med–* встречался в 4,3 раза реже ($p = 0,049$). Установлен единственный случай коинфицирования разными вариантами *LMP-1*, когда у пациента с ВЭБ-ИМ одновременно были выявлены отличающиеся варианты вируса в слюне *(B95-8)* и лейкоцитах крови *(China 1)*.

Осуществлен поиск делеций и вставок. Всего выявлено 4 варианта делеций: две из них, так называемые САО-подобные делеции (30 н.о./10 а.к., охватывающая кодоны 246–355, и 15 н.о./5 а.к. в области повторяющихся повторов в положении 276–280), а две другие делеции выявлены впервые (6 н.о./2 а.к. в положениях аминокислот 215–216 и 63 н.о./21 а.к. в координатах 335–355). Общая частота делеций в группе детей с ВЭБ-ИМ составила 60,6±6,0%, а ВЭБ-ЗД — 77,4±7,5% ($p = 0,162$) (табл. 2).

Все последовательности ДНК ВЭБ с делецией 30 н.о./10 а.к. были ассоциированы с вариантом *LMP-1 China 1*. Они выявлялись как в груп-

[4] URL: https://www.R-project.org
[5] URL: http://www.rstudio.com

пе ВЭБ-ИМ (18,2±4,7%), так и в группе ВЭБ-ЗД (9,7±5,3%). Различия данных показателей между группами были статистически незначимыми (p = 0,433). Делеция 6 н.о./2 а.к. обнаружена только в изолятах вируса, относящихся к варианту *LMP-1 Med–*, у одного пациента с ВЭБ-ИМ и одного здорового вирусоносителя. Единственным источником вируса (вариант *LMP-1 B95-8*), несущего делецию 63 н.о./21 а.к., являлся больной ребенок.

Проведен анализ числа и аминокислотного состава повторяющихся мотивов в области тандемных повторов С-концевого участка *LMP-1* (а.к. 253–306). Табл. 3 демонстрирует существенный вклад области тандемных повторов в генетическое разнообразие нижегородских изолятов ВЭБ. Полученные нами последовательности отличались по числу повторов, которое колебалось от 3 до 7, наличию делеции из 5 а.к., присутствию модифицированных повторяющихся мотивов и спектру аминокислотных замен в них. В половине (50,5±5,1%) анализируемых последовательностей был представлен прототипный вариант из 4,5 повторов, все они были ассоциированы исключительно с вариантом *LMP-1 B95-8*. В изолятах *China 1, NC, Med–* и *Alaskan* число повторов варьировало в установленном диапазоне, при этом мотив

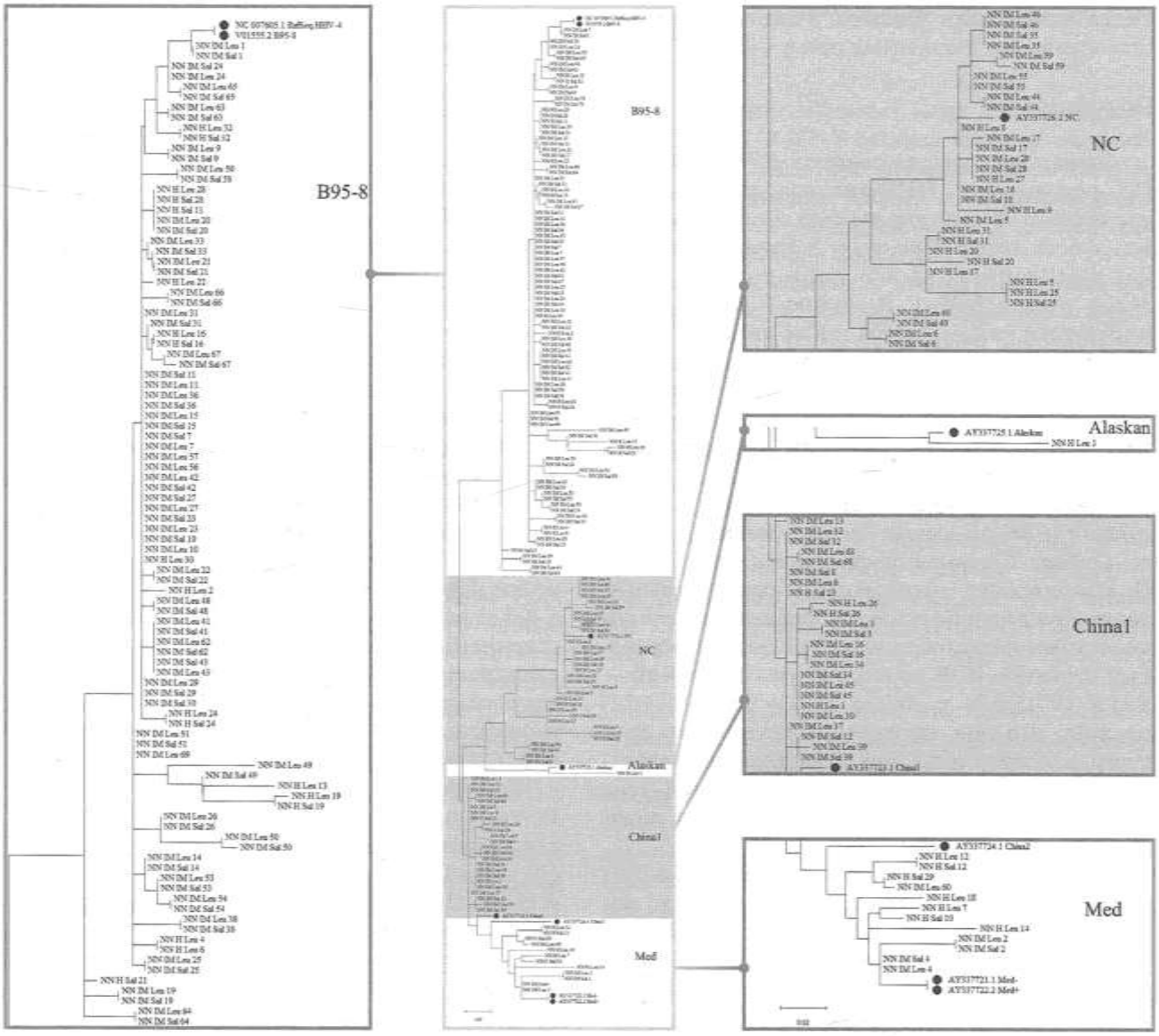


Рисунок. Филогенетическое дерево, построенное на основе сравнения аминокислотных последовательностей С-концевого фрагмента *LMP-1*, принадлежащих 165 нижегородским изолятам ВЭБ, и 8 референсных последовательностей, полученных из базы данных GenBank/NCBI (метод максимального правдоподобия)

Figure. Phylogenetic tree constructed based on comparison of the amino acid sequences of the *LMP-1* C-terminal fragment from 165 EBV isolates in the Nizhny Novgorod region and 8 reference sequences obtained from the GenBank/NCBI database (Maximum Likelihood method)

Таблица 2. Делеции в С-концевой области *LMP-1* ВЭБ и частота их встречаемости в группах ВЭБ-ИМ и ВЭБ-ЗД

Table 2. Deletions in the C-terminal region of EBV *LMP-1* and their frequency in the EBV-IM (Infectious Mononucleosis) and EBV-HVC (Healthy Virus Carriers) groups

Группа сравнения Comparison group	Единицы измерения Units	Делеции/Deletions					Без делеций Not deleted
		6 н.о./2 а.к. (а.к. 215–216) 6 nt./2 aa. (aa. 215–216)	15 н.о./5 а.к. (а.к. 276–280) 15 nt./5 aa. (aa. 276–280)	30 н.о./10 а.к. (а.к. 346–355) 30 nt./10 aa. (aa. 346–355)	63 н.о./21 а.к. (а.к. 335–355) 63 nt./21 aa. (aa. 335–355)	Всего Total	
ВЭБ-ИМ EBV-IM (n = 66)	абс./abs.	1	26	12	1	40	26
	P±σp, %	1,5±1,5	39,4±6,0	18,2±4,7	1,5±1,5	60,6±6,0	39,4±6,0
ВЭБ-ЗД EBV-HVC (n = 31)	абс./abs.	1	20	3	0	24	7
	P±σp, %	3,2±3,2	64,5±8,6	9,7±5,3	0	77,4±7,5	22,6±7,5
Уровень значимости различий p-value		p = 0,832	p = 0,021	p = 0,433	–	p = 0,162	p = 0,162

из 5 а.к. между повторами из 11 а.к. во всех этих последовательностях отсутствовал.

Показано, что в любом варианте *LMP-1 (B95-8, China 1, Med–* и *NC)* в области тандемных повторов могут быть обнаружены аминокислотные замены. Однако вариант *LMP-1 Med–* отличался наибольшей вариабельностью в области тандемных повторов. Практически каждая из 9 анализируемых последовательностей *Med–* была уникальной за счет комбинации разного числа повторов и расположения друг относительно друга повторяющихся прототипных и модифицированных последовательностей из 11 а.к. Модифицированные последовательности в варианте *Med–* характеризует замена аспарагиновой кислоты на глицин в третьем положении аминокислоты во втором — седьмом мотивах: D266G, D277G, D282G, D293G. Аминокислотные транзиции D282G, D293G также выявлялись в изоляте *LMP-1 Alaskan*. В мотиве PHDPL, завершающем область тандемных повторов, в отдельных последовательностях присутствовали штамм-характерные аминокислотные замены в положении 306 аминокислоты: в варианте *NC* — лейцина на глутамин L306Q (PHDP***Q***), в *Alaskan* — лейцина на пролин L306P (PHDP***P***).

Выявлено, что изоляты ВЭБ из разных компартментов (лейкоциты крови и слюна) от одного источника и отнесенные к одному варианту *LMP-1* могут быть гетерогенными по своей структуре за счет вариации в области тандемных повторов или по составу аминокислотных замен. Так, в изоляте из лейкоцитов крови ребенка с ВЭБ-ИМ *(China 1)* область тандемных повторов включала четыре прототипных и один модифицированный (D288G) мотив из 11 а.к., в то время как в последовательности белка вируса, выделенного из слюны, все пять были типичными.

Осуществлен поиск полного спектра аминокислотных замен в пределах анализируемого С-концевого фрагмента белка *LMP-1* с 187 по 386 а.к. Суммарно в нижегородских изолятах ВЭБ идентифицировано 100 мутаций аминокислот в 65 локусах (относительно референсной последовательности NC_007605.1). Последовательностей, идентичных дикому штамму ВЭБ, не выявлено. Минимальное число аминокислотных замен (две) обнаружено в единственном изоляте *LMP-1 B95-8*, а наиболее дивергентная последовательность (16 замен) характеризовала изолят *LMP-1 Med–*. Для наглядного сравнения степени дивергенции между вариантами *LMP-1* проведен расчет индекса, характеризующего среднее число аминокислотных замен, приходящихся на одну последовательность. Анализ выполнен дифференцировано в группах ВЭБ-ИМ и ВЭБ-ЗД. Получены следующие значения индекса: *B95-8* — 3,9 и 4,1; *China 1* — 6,7 и 6,7; *Med–* — 12,0 и 12,3; *NC* — 11,5 и 11,3 соответственно. В единственном изоляте *Alaskan* содержалось 14 аминокислотных замен. Все выявленные замены по частоте распространения были объединены в три группы.

I группу составили наиболее распространенные в популяции ВЭБ Нижегородского региона 4 замены: G212S, S366T, E328Q и S309N. Замены G212S и S366T присутствовали во всех пяти выявленных вариантах *LMP-1*, их частота в группе ВЭБ-ИМ составила 95,5±2,1 и 97,0±2,1%, а в группе ВЭБ-ЗД — 100±0 и 83,9±6,6% соответственно. Замена серина на аспарагин в 309 позиции (S309N) присутствовала в составе всех анализируемых последовательностей вариантов *China 1, NC, Med–* и *Alaskan*. Аминокислотная транзиция E328Q выявлена только в изолятах *LMP-1 B95-8* в 100% последовательностей.

Во II группу включены аминокислотные замены с частотой 10–25% от общего числа изо-

Таблица 3. Характеристика числа и аминокислотного состава повторяющихся мотивов в С-концевой области *LMP-1* ВЭБ

Table 3. Characteristics of the number and amino acid composition of repeating motifs in the C-terminal region of EBV *LMP-1*

Штамм Strain	**ВЭБ-ИМ** EBV-IM **(n = 66)**	**ВЭБ-ЗД** EBV-HVC **(n = 31)**	**Повторяющиеся мотивы в С-концевой области *LMP-1* ВЭБ (а.к. 253–306)** Repeated motifs in the C-terminal region of EBV *LMP-1* (aa. 253–306)	**Повторы** Repeats
NC_007605.1 (RefSeq *HHV4*)			PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL - - - - - - - PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL	4,5
B95-8	38/41	11/13	PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL - - - - - - - PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL	4,5
	1/41	–	PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL - - - - - - - PQDPDNTDDNG PQDPDNT**E**DNG PHDPL	4,5
	2/41	–	PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL - - - - - - - PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL	5,5
	–	1/13	PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL	4
	–	1/13	PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDN**A**DDNG PHDPL	4
China 1	1/12	–	PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL	3
	9/12	2/3	PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL	5
	1/12	–	PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTD**G**NG PQDPDNTDDNG PHDPL	5
	1/12	–	PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL	6
	–	1/3	PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL	7
Med–	–	1/6	PQDPDNTDDNG PQ**G**PDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQ**G**PDNTDDNG PHDPL	4
	1/3	–	PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQ**G**PDNTDDDG PQ**G**PDNTDD**D**G PHDPL	4
	–	1/6	PQDPDNTDDNG PQ**G**PDNTDDNG PQ**G**PDNTDDNG PQ**G**PDNTDDNG PHDPL	4
	1/3	–	PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQ**G**PDNTDDNG PQ**G**PDNTDDNG PQ**G**PDNTDDNG PHDPL	5
	–	2/6	PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQ**G**PDNTDDNG PQ**G**PDNTDDNG PHDPL	5
	–	1/6	PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQ**G**PDNTDDNG PQGPDNTDDNG PHDPL	6
	–	1/6	PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNT**N**DNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQ**G**PDNTDDNG PQ**G**PDNTDDNG PHDPL	7
	1/3	–	PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQ**G**PDNTDDNG PQ**G**PDNTDDNG PHDPL	7
NC	5/11	1/8	PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDP**Q**	3
	–	1/8	PQDPDNT**N**DNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDP**Q**	3
	1/11	–	PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQD - - - - - - NG PQDPDNTDDNG PHDP**Q**	3,5
	3/11	3/8	PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDP**Q**	4
	–	1/8	PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDANG PHDP**Q**	4
	–	1/8	PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDP**Q**	5
	2/11	1/8	PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDP**Q**	6
ALASKAN	–	1/1	PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQ**G**PDNTDDNG PQ**G**PDNTDDNG PHDP**P**	5

Примечание. PQDPDNTDDNG — повторяющийся мотив из 11 а.к., PHDPL — повторяющийся мотив из 5 а.к., полужирным выделены аминокислотные замены.

Note. PQDPDNTDDNG -11 aa. repeated motif; PHDPL — 5 aa. repeated motif; amino acid substitutions are in bold.

лятов. В их числе 10 сигнатурных аминокислотных замен в 6 основных локусах (S229T, L306Q, L306P, D312N, Q322E, Q322N, Q322T, Q334R, L338S, L338P), которые используются при дифференциальной оценке вариантов *LMP-1* по классификации R.H. Edwards и соавт. [24]. В эту группу вошли также дополнительные штамм-характерные мутации для *China 1* (E214Q), *NC* (D250N, S313P, G331Q, H352N, H358P) и *Med–* (замена аспарагиновой кислоты на глицин в третьем положении аминокислоты в повторяющемся мотиве из 11 а.к.: D266G, D282G, D293G и т.д.).

III группа представлена широким спектром аминокислотных замен, которые в нижегородских изолятах ВЭБ встречались спорадически (< 10%). Среди них D210A, G243A, G252A, D317Y, E326D, D349N, H352R, T361M, L364W, S366A, S367Y обнаруживали в единичных изолятах, отнесенных к разным вариантам *LMP-1*, независимо от формы ВЭБ-инфекции. Кроме того, замены E214Q, S229T, D250N, S309N, Q322T, Q334R, L338P, L338S встречались в нехарактерных штаммах. Отдельные аминокислотные замены выявлялись только в каком-то одном варианте *LMP-1*, при этом определенная часть из них не дублировала друг друга в группах ВЭБ-ИМ и ВЭБ-ЗД:

– *B95-8*: ВЭБ-ИМ/ВЭБ-ЗД — E328Q; ВЭБ-ИМ — A207P, D209H, D210Y, E214D, E214K, E214N, H225R, D298E, G315E, G351S, H352K, G354S, G355N, G355V, D356N, P357S, T361K; ВЭБ-ЗД — D210S, E214H, D216H, D216N, E221D, D285A, D288A, L323F, G331S, S350P, L359R, L364F;

– *China 1*: ВЭБ-ИМ/ВЭБ-ЗД — Q322N; ВЭБ-ИМ — D288G;

– *Med–*: ВЭБ-ИМ/ВЭБ-ЗД — D277G, D282G, D293G, Q322E, V327D, D333H; ВЭБ-ИМ — G246E, N289D, Q322D, Q334K, P337A; ВЭБ-ЗД — G222A, G222S, R223T, H225N, D266G, S311I, A314T, E328G, K330T, D333A, G335S, H348Y, G351A, D356P;

– *NC*: ВЭБ-ИМ/ВЭБ-ЗД — L306Q, S313P, G331Q, H352N, H358P; ВЭБ-ИМ — G335D, P357Q, G368S; ВЭБ-ЗД — G243H, G260N, G331R;

– *Alaskan*: ВЭБ-ЗД — G232A, L306P, S309N, D312N, S313A, G331A, L338P, G353R, G345S, G354D, G355T.

Наиболее «горячими» точками замен стали аминокислоты в положениях 214 (пять), 322 и 331 (по четыре). Отметим, что относительно часто и только при ВЭБ-ИМ встречались транзиции D209H в изолятах *B95-8* (5/41) и G335D в изолятах *NC* (5/11).

Анализ изученных ранее другими исследователями аминокислотных замен в контексте так называемых САО-подобных мутаций (первый штамм, полученный от пациента с РНГ в Китае) показал, что в нижегородских изолятах замены G212S и S366T имеются практически во всех установленных последовательностях, Q322N является уникальной заменой для штамма *China 1*, а Q334R, L338S — сигнатурные замены, характеризующие штаммы *China 1* и *Med–*. Такие транзиции, как Q189P, S192T и E328A, в анализируемых последовательностях обнаружены не были.

Обсуждение

К настоящему времени литературные данные, полученные разными исследовательскими группами, продемонстрировали высокую степень генетической гетерогенности ВЭБ, циркулирующего во всем мире [2, 10, 12, 13, 16, 17, 23, 33, 37, 40, 41]. Исторически первой классификацией ВЭБ и, как подтверждают современные работы, главным паттерном его генетического разнообразия является деление на два основных типа — ВЭБ-1 и ВЭБ-2 [22]. Однако на момент начала проведения настоящего исследования данные о типовой структуре вирусной популяции ВЭБ в РФ отсутствовали. В представленной работе оптимизированный нами ранее методический подход к дифференциальной детекции ВЭБ-1/ВЭБ-2 [4, 5] позволил оценить распространенность разных типов вируса в детской популяции Нижегородского региона. Полученные данные о доминирующем положении ВЭБ-1 среди нижегородских изолятов соответствуют предыдущим оценкам распространенности ВЭБ-1 и ВЭБ-2 среди населения разных регионов мира.

Известно, что оба типа ВЭБ встречаются повсеместно. Однако ВЭБ-1 преобладает среди населения Европы, Северной и Южной Америки, Китая, Юго-Восточной Азии, Австралии [12, 16, 29, 31, 37, 41]. В то же время ВЭБ-2 считается характерным типом вируса, циркулирующим в регионе Африки к югу от Сахары и Папуа — Новой Гвинеи [18, 44]. Относительно небольшой процент представителей европеоидной расы инфицированы ВЭБ-2 [22]. Предполагается, что инфицирование ВЭБ-2 может происходить в условиях хронической иммунной активации, например, в тех частях Африки, где много сопутствующих инфекций, включая малярию, или у иммунокомпрометированных лиц [25, 44].

Основное фенотипическое различие между двумя типами вируса заключается в том, что ВЭБ-1 трансформирует В-лимфоциты человека более эффективно, чем ВЭБ-2 [18, 39]. Но недавние сообщения о том, что ВЭБ-2 инфицирует Т-клетки как в культуре, так и *in vivo* (например, у кенийских детей) определяют необходимость продолжения исследований биологического значения основных типов ВЭБ [20, 21]. Кроме

того, до настоящего времени имеется мало доказательств о связи заболеваний с определенным типом ВЭБ.

Ген *LMP-1* ВЭБ и кодируемый им одноименный белок многие десятилетия привлекали внимание ученых всего мира в связи с их выраженным структурно-функциональным полиморфизмом и высоким онкогенным потенциалом. В РФ за последние 20 лет были проведены исследования гена *LMP-1* ВЭБ в контексте изучения его особенностей в неэндемичном по ВЭБ-ассоциированным онкологическим заболеваниям регионе мира. Основная часть полученных к настоящему времени результатов российских исследователей была сгенерирована на основе применения методических подходов, включающих секвенирование по Сэнгеру, главным образом, С-концевой области гена *LMP-1* с последующей оценкой его геновариантов по классификации R.H. Edwards и соавт. [24]. При ВЭБ-ассоциированных онкологических заболеваниях среди представителей разных регионов России образцы *LMP-1* были отнесены к вариантам *B95-8*, *China 1*, *Med+* и *Med–* и *NC* [1, 3, 6]. Результаты исследований среди здорового населения свидетельствуют о том, что частота выявления геновариантов *LMP-1* в разных регионах и этнических группах на территории РФ существенно различается. Выявленные в российской популяции варианты *LMP-1* «вне варианта» классификации по R.H. Edwards и соавт. [24], а также вновь выявленные точечные мутации до сих пор остаются фенотипически не охарактеризованными [1, 3, 9, 10]. Сведения о проведении полногеномных исследований ВЭБ в России отсутствуют.

В нашем исследовании на основе метода секвенирования по Сэнгеру С-концевого фрагмента гена *LMP-1* проведено субтипирование полученных нижегородских изолятов ВЭБ от детей с разными формами ВЭБ-инфекции. Поскольку до настоящего времени другими исследователями вариабельность данного гена оценивалась с позиции изменений аминокислот, а не нуклеотидов, мы также обобщили полученные нами результаты на аминокислотном уровне (в координатах а.к. 187–386). Установлена штаммовая принадлежность нижегородских изолятов ВЭБ по классификации R.H. Edwards и соавт. [24]. В общем выявлено 5 из 7 известных вариантов *LMP-1*, а именно *B95-8*, *China 1*, *Med–*, *NC* и *Alaskan*. Результаты собственных исследований дополняют уже имеющиеся сведения о доминировании на территории Европейской части России прототипного варианта *LMP-1 B95-8* [1, 6, 10]. До сих пор варианты *LMP-1 China 2*, *China 3* и *Alaskan* среди россиян полностью отсутствовали [1, 3, 6, 7, 9]. Впервые в РФ нами обнаружен вариант *LMP-1 Alaskan*. Отметим, что изолят ВЭБ, в котором он был идентифицирован, принадлежал к типу ВЭБ-2. При сравнительной оценке с данными других исследователей следует учитывать тот факт, что в Нижегородском регионе проживает многонациональное население, и нами впервые были обследованы дети с ВЭБ-инфекцией, а не взрослые.

К настоящему времени накоплены сравнительные данные о биологических свойствах вариантов *LMP-1*. В разных исследованиях было продемонстрировано, что варианты САО [44], а также *Alaskan*, *China 1* и *Med+* повышают активность транскрипционного фактора NF-κB по сравнению с другими вариантами [32]. Особое внимание было сосредоточено на делеции в 30 н.о./10 а.к. (а.к. 346–355) [1, 27, 44]. Делетированный вариант продемонстрировал выраженную трансформирующую активность по сравнению с прототипным *B95-8* в фибробластах грызунов или эпителиальных клетках, имплантированных голым мышам [18], а также имел повышенный риск отдаленного метастазирования [35, 44]. В настоящее время установлено широкое распространение вариантов *LMP-1* с этой делецией как среди больных ВЭБ-ассоциированными заболеваниями, так и у здоровых носителей ВЭБ во всем мире. Результаты проведенного нами исследования подтверждают неспецифический характер данного полиморфизма для ИМ, но не исключают его влияния на выраженность клинических проявлений инфекции.

В половине нижегородских изолятов в области тандемных повторов выявлена делеция 5 а.к. между повторяющимися мотивами из 11 а.к., которую также относят к числу САО-подобных [27]. Отметим, что интерпретация ее координат остается в разных исследовательских работах неоднозначной (а.к. 275–279 или а.к. 276–280) [7, 27]. В нашем исследовании впервые была обнаружена делеция 63 н.о./21 а.к. в координатах а.к. 335–355. В общем, обширные делеции 64 и 69 п.н, перекрывающие участок делеции из 10 а.к., выявляются, как правило, редко [8]. Считается, что они связаны со снижением активации фактора транскрипции АР-1 [41].

Продемонстрирована существенная вариабельность области тандемных повторов (а.к. 253–306). Известно, что последовательности референсных штаммов ВЭБ имеют четыре идеальных повтора, состоящих из 11 а.к. (PQDPDNTDDNG) с разрывом в 5 а.к. (PHDPL) между вторым и третьим повторами. Аналогичный мотив из 5 а.к. PHDPL является завершающим область тандемных повторов (а.к. 302–306). Отметим, что при предоставлении результатов, характеризующих область тандемных повторов, одни группы исследователей используют вариант обозначения «4,5 повто-

ра» [16, 26], а другие описывают количество всех повторов из 11 а.к. и 5 а.к. по-отдельности [2, 3, 7, 10]. Поскольку последний фрагмент из 5 а.к. во всех последовательностях присутствует постоянно, мы склоняемся к трактованию результатов, основанному на принципе «4,5 повтора». Заслуживают внимания работы, в которых была выявлена статистически значимая связь числа повторов с заболеваниями. Так, аргентинские исследователи установили, что изоляты из ткани опухолей чаще содержат 5,5 повторов [26], а сербские ученые обнаружили, что повышение аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы у больных ИМ, всегда ассоциировано с вариантами ВЭБ с 3-мя или 4-мя повторами [16].

Аминокислотные замены G212S, Q322N, L338S и S366T по данным литературы сопряжены с САО-подобными вариантами *LMP-1* (*China 1* и *Med*). Несмотря на то, что замена в 212 положении является штамм-характерной для *China 1*, *China 2*, *China 3* и *Alaskan* [24], в российских изолятах *LMP-1* до недавнего времени отмечалось ее полное отсутствие [1]. Лишь относительно недавно появились сообщения о ее выявлении на территории РФ [9]. Примечательно, что в основной части нижегородских изолятов ВЭБ была выявлена двойная замена G212S/S366T. Данное сочетание, как ранее было изучено, функционально ассоциировано с повышением уровня активации сигнального пути NF-κB и протеинкиназы-B (PKB/Akt) [1, 8]. По данным других исследователей любая из замен (G212S либо S366T) ассоциирована с усилением активации Erk и индукции экспрессии c-Fos [45], что влияет на процессы выживания, пролиферации, дифференцировки и миграции клеток. По данным литературы у больных РНГ из России довольно часто наблюдали замену S366A [6], которая также была нами обнаружена в двух нижегородских изолятах у детей с ИМ (варианты *B95-8* и *China 1*).

Замена E328Q достаточно широко распространена среди жителей России [7, 11], встречается в изолятах ВЭБ от больных ИМ и РНГ в Сербии [15, 16]. Ее функциональную роль связывают со снижением цитотоксичности и усилением трансформирующей активности белка *LMP-1*. В нижегородских изолятах ВЭБ данная мутация ассоциирована исключительно с вариантом *LMP-1 B95-8* с частотой выявления 100%. Предполагается, что обнаруженные аминокислотные замены в 212, 328 и 366 положениях *LMP-1* придают этому онкобелку агрессивные характеристики и характерны для высокотуморогенных вариантов [7].

Остальная часть выявленных в настоящем исследовании мутаций остаются фенотипически не охарактеризованными. Можно предположить, что они потенциально могут изменять профиль внутриклеточной активности ряда сигнальных путей и их биологические свойства [9]. Для выяснения роли каждого из них необходимо проведение экспериментальных работ *in vitro* и *in vivo*.

Как общая тенденция, при активной ВЭБ-инфекции (ИМ) отмечено появление гетерогенных по структуре последовательностей ВЭБ, выделенных из лейкоцитов крови и слюны от одного инфицированного лица. Отличающиеся геноварианты ВЭБ в одном биологическом образце, так называемые корезидентные варианты, в данном исследовании не были выявлены. По сложившимся представлениям гетерогенность *LMP-1* ВЭБ чаще возникает во время репликации вирусного генома в ротоглотке [38]. Отметим, что о множественных штаммах наиболее часто сообщается в работах, выполненных на основе гетеродуплексного анализа [40, 43].

Заключение

Применение оптимизированного варианта однораундовой ПЦР позволило оценить типовую структуру ВЭБ, циркулирующего среди детей в Нижегородском регионе. Во всех клинических изолятах, установленных от больных ВЭБ-ИМ, идентифицирован только ВЭБ-1, среди здоровых вирусоносителей доля ВЭБ-1 составила 93,8±4,3%, а ВЭБ-2 — 6,2±4,3%. Случаев коинфекции обоими типами вируса не выявлено.

С использованием метода секвенирования по Сэнгеру С-концевого фрагмента гена *LMP-1* получены новые данные о распространенности различных вариантов вируса при активной и латентной ВЭБ-инфекции у детей. Всего выявлено 5 вариантов *LMP-1*: *B95-8*, *China 1*, *Med–*, *NC* и *Alaskan*, среди которых доминировал геновариант *B95-8*. Вариант *Alaskan* в РФ выявлен впервые. Варианты *Med+*, *China 2* и *China 3* не были обнаружены ни в одном из исследованных образцов.

Определено, что наиболее распространенными в нижегородских изолятах ВЭБ у детей являются 4 аминокислотные замены: G212S, S366T, E328Q и S309N, которые характеризуются высоким трансформирующим потенциалом инфицированных клеток преимущественно за счет активации сигнального пути NF-κB.

Сравнительный анализ показал, что штаммы, делеции, повторы, аминокислотные замены в изолятах ВЭБ из биологических образцов у детей с активной ВЭБ-инфекцией имели общие характеристики с группой здоровых вирусоносителей. Как общая тенденция, при активной форме ВЭБ-инфекции отмечено появление случаев несовпадающих штаммов и вариантов

ВЭБ между разными компартментами (лейкоциты крови и слюна) в организме одного инфицированного лица.

В целом оценка генетического разнообразия ВЭБ является основой для решения ключевого вопроса о потенциальной взаимосвязи разных геновариантов ВЭБ с особенностями клинического течения ВЭБ-ассоциированных заболеваний, разработки средств их специфической профилактики и лечения, перспективного развития молекулярно-генетического мониторинга циркулирующих геновариантов вируса и совершенствования системы эпидемиологического надзора за ВЭБ-инфекцией.

Список литературы/References

1. Гончарова Е.В., Сенюта Н.Б., Смирнова К.В., Щербак Л.Н., Гурцевич В.Э. Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) в России: инфицированность населения и анализ вариантов гена LMP1 у больных ВЭБ-ассоциированными патологиями и у здоровых лиц // Вопросы вирусологии. 2015. Т. 60, № 2. С. 11–17. [Goncharova E.V., Senyuta N.B., Smirnov K.V., Shcherbak L.N., Gurtsevich V.E. Epstein–Barr virus (EBV) in Russia, the infection of the population and the analysis of gene LMP1 variants at the patients with EBV-associated disease and at healthy patients. *Voprosy virusologii = Problems of Virology, 2015, vol. 60, no. 2, pp. 11–17. (In Russ.)*]
2. Гурцевич В.Э., Лубенская А.К., Сенюта Н.Б., Душенькина Т.Е., Смирнова К.В. Вирус Эпштейна–Барр (Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4) у калмыков и славян, проживающих на территории России: типы вируса, варианты онкогена LMP1 и злокачественные опухоли // Вопросы вирусологии. 2022. Т. 67, № 3. С. 246–257. [Gurtsevitch V.E., Lubenskaya A.K., Senyuta N.B., Dushenkina T.E., Smirnova K.V.Epstein–Barr virus (Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4) in Kalmyks and Slavs living in Russia: virus types, LMP1 oncogene variants, and malignancies. *Voprosy virusologii = Problems of Virology, 2022, vol. 67, no. 3, pp. 246–257. (In Russ.)*] *doi: 10.36233/0507-4088-120*
3. Гурцевич В.Э., Смирнова К.В., Ботезату И.В., Душенькина Т.Е., Лубенская А.К., Дубар Э., Сенюта Н.Б., Лихтенштейн А.В., Петров С.В. Полиморфизм онкогена LMP1 вируса Эпштейна–Барр в двух этнических группах россии, татар и славян, и его влияние на развитие некоторых злокачественных опухолей // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 2. С. 347–358. [Gurtsevitch V.E., Smirnova K.V., Botezatu I.V., Dushenkina T.E., Lubenskaya A.K., Dubar E., Senyuta N.B., Lichtenstein A.V., Petrov S.V. Epstein–Barr virus LMP1 oncogene polymorphism in tatar and slavic populations in Russian Federation impacting on some malignant tumours. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2020, vol. 10, no. 2, pp. 347–358. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-EBV-1162*
4. Попкова М.И., Уткин О.В., Брызгалова Д.А., Сенатская А.О., Соболева Е.А., Сахарнов Н.А., Филатова Е.Н., Кулова Е.А. Методические подходы к дифференциальной детекции ВЭБ-1/ВЭБ-2 и ВГЧ-6А/ВГЧ-6В в слюне // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 3. С. 461–474. [Popkova M.I., Utkin O.V., Bryzgalova D.A., Senatskaia A.O., Soboleva E.A., Sakharnov N.A., Filatova E.N., Kulova E.A. Methodological approaches to differential detection of EBV1/EBV2 and HHV6A/HHV6B in saliva. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2022, vol. 12, no. 3, pp. 461–474. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-MAT-1807*
5. Попкова М.И., Уткин О.В., Соболева Е.А., Сахарнов Н.А., Брызгалова Д.А., Сенатская А.О., Кулова Е.А. Методические основы дифференциальной детекции ВЭБ1/ВЭБ2 и ВГЧ6А/ВГЧ6В // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 6. С. 1057–1066. [Popkova M.I., Utkin O.V., Soboleva E.A., Sakharnov N.A., Bryzgalova D.A., Senatskaia A.O., Kulova E.A. Methodological basics for differential detection of EBV1/EBV2 and HHV6A/HHV6B. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2021, vol. 11, no. 6, pp. 1057–1066. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-MBF-1661*
6. Сенюта Н.Б., Смирнова К.В., Дидук С.В., Гончарова Е.В., Щербак Л.Н., Гурцевич В.Э. Структурно-функциональная характеристика онкогена LMP1 у больных с опухолями, ассоциированными и не ассоциированными с вирусом Эпштейна–Барр // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2016. Т. 34, № 2. С. 71–75. [Senyuta N.B., Smirnova K.V., Diduk S.V., Goncharova E.V., Shcherbak L.N., Gurtsevitch V.E. Structural and functional characteristics of the LMP1 oncogene in patients with tumors associated and not associated with the Epstein–Barr virus. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology, 2016, vol. 31, no. 2, pp. 87–93. (In Russ.)*] *doi: 10.18821/0208-0613-2016-34-2-71-75*
7. Смирнова К.В., Дидук С.В., Гурцевич В.Э. Полиморфизм онкогена LMP1 вируса Эпштейна–Барр у представителей коренного малочисленного народа Дальнего Востока России // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2017. Т. 22, № 5. С. 239–247. [Smirnova K.V., Diduk S.V., Gurtsevitch V.E. Polymorphism of Epstein–Barr virus LMP1 oncogene in nanaians, representatives of indigenous minority of the Russian Far East. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Deseases, 2017, vol. 22, no. 5, pp. 239–247. (In Russ.)*] *doi: 10.18821/1560-9529-2017-22-5-239-247*
8. Смирнова К.В., Дидук С.В., Сенюта Н.Б., Гурцевич В.Э. Молекулярно-биологические свойства гена lmp1 вируса Эпштейна–Барр: структура, функции и полиморфизм // Вопросы вирусологии. 2015. Т. 60, № 3. С. 5–13. [Smirnova K.V., Diduk S.V., Senyuta N.B., Gurtsevitch V.E. Molecular biological properties of the Epstein–Barr virus LMP1 gene: structure, function and polymorphism. *Voprosy virusologii = Problems of Virology, 2015, vol. 60, no. 3, pp. 5–13. (In Russ.)*]
9. Смирнова К.В., Сенюта Н.Б., Ботезату И.В., Душенькина Т.Е., Лубенская А.К., Фроловская А.А., Петров С.В., Лихтенштейн А.В., Гурцевич В.Э. Вирус Эпштейна–Барр у этнических татар: инфицированность и сиквенсные варианты онкогена LMP1 // Успехи молекулярной онкологии. 2018. Т. 5, № 3. С. 65–74. [Smirnova K.V., Senyuta N.B., Botezatu I.V., Dushenkina T.E., Lubenskaya A.K., Frolovskaya A.A., Petrov S.V., Lichtenstein A.V., Gurtsevitch V.E. Epstein–Barr virus in the ethnic Tatars population: the infection and sequence variants of LMP1 oncogene. *Uspekhi molekulyarnoi onkologii = Advances in Molecular Oncology, 2018, vol. 5, no. 3, pp. 65–74. (In Russ.)*] *doi: 10.17650/2313-805X-2018-5-3-65-74*

10. Смирнова К.В., Сенюта Н.Б., Лубенская А.К., Душенькина Т.Е., Гурцевич В.Э. Древние варианты вируса Эпштейна–Барр (Herpesviridae, Lymphocryptovirus, HHV-4): гипотезы и факты // Вопросы вирусологии. 2020. Т. 65, № 2. С. 77–86. [Smirnova K.V., Senyuta N.B., Lubenskaya A.K., Dushenkina T.E., Gurtsevich V.E. Ancient variants of the Epstein–Barr virus (Herpesviridae, Lymphocryptovirus, HHV-4): hypotheses and facts. *Voprosy virusologii = Problems of Virology, 2020, vol. 65, no. 2, pp. 77–86. (In Russ.)*] *doi: 10.36233/0507-4088-2020-65-2-77-86*
11. Яковлева Л.С., Сенюта Н.Б., Гончарова Е.В., Щербак Л.Н., Смирнова К.В., Павлиш О.А., Гурцевич В.Э. Варианты онкогена LMP1 вируса Эпштейна–Барр в клеточных линиях различного происхождения // Молекулярная биология. 2015. Т. 49, № 5. С. 800–810. [Yakovleva L.S., Senyuta N.B., Goncharova E.V., Scherback L.N., Smirnova R.V., Pavlish O.A. Gurtsevitch V.E. Epstein–Barr Virus LMP1 oncogene variants in cell lines of different origin. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology, 2015, vol. 49, no. 5, pp. 800–810. (In Russ.)*] *doi: 10.7868/S0026898415050213*
12. Ai J.H., Xie Z.D., Liu C.Y., Gao L.W., Yan J. [Characteristic of nuclear antigen 1 gene and latent membrane protein 1 gene of Epstein–Barr virus in primary EBV infection in children in Beijing area in 2005–2010]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi, 2012, vol. 26, no. 5, pp. 352–355. (In Chin.)*
13. Arturo-Terranova D., Giraldo-Ocampo S., Castillo A. Molecular characterization of Epstein–Barr virus variants detected in the oral cavity of adolescents in Cali, Colombia. *Biomedica, 2020, vol. 40, no. 1, pp. 76–88. doi: 10.7705/biomedica.4917*
14. Baer R., Bankier A.T., Biggin M.D., Deininger P.L., Farrell P.J., Gibson T.G. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein–Barr virus genome. *Nature (London), 1984, vol. 310, pp. 207–211. doi: 10.1038/310207a0*
15. Banko A.V., Lazarevic I.B., Folic M.M., Djukic V.B., Cirkovic A.M., Karalic D.Z., Cupic M.D., Jovanovic T.P. Characterization of the variability of Epstein–Barr virus genes in nasopharyngeal biopsies: potential predictors for carcinoma progression. *PLoS One, 2016, vol. 11, no. 4: e0153498. doi: 10.1371/journal.pone.0153498*
16. Banko A.V., Lazarevic I.B., Stevanovic G., Cirkovic A., Karalic D., Cupic M., Banko B., Milovanovic J., Jovanovic T. Analysis of the variability of Epstein–Barr virus genes in infectious mononucleosis: investigation of the potential correlation with biochemical parameters of hepatic involvement. *J. Med. Biochem., 2016, vol. 35, no. 3, pp. 337–346. doi: 10.1515/jomb-2015-0021*
17. Blazquez A.C., Berenstein A.J., Torres C., Izquierdo A., Lezama C., Moscatelli G., De Matteo E.N., Lorenzetti M.A., Preciado M.V. Comprehensive evolutionary analysis of complete Epstein–Barr virus genomes from argentina and other geographies. *Virus, 2021, vol. 13, no. 6: 1172. doi: 10.3390/v13061172*
18. Bridges R., Correia S., Wegner F., Venturini C., Palser A., White R.E., Kellam P., Breuer J., Farrell P.J. Essential role of inverted repeat in Epstein–Barr virus IR-1 in B cell transformation; geographical variation of the viral genome. *Philos. Trans. R. SoC. Lond. B Biol. Sci., 2019, vol. 374, no. 1773: 20180299. doi: 10.1098/rstb.2018.0299*
19. Bristol J.A., Djavadian R., Albright E.R., Coleman C.B., Ohashi M., Hayes M., Romero-Masters J.C., Barlow E.A., Farrell P.J., Rochford R., Kalejta R.F., Johannsen E.C., Kenney S.C. A cancer-associated Epstein–Barr virus BZLF1 promoter variant enhances lytic infection. *PLoS Pathog., 2018, vol. 14, no. 7: e1007179. doi: 10.1371/journal.ppat.1007179*
20. Coleman C.B., Daud I.I., Ogolla S.O., Ritchie J.A., Smith N.A., Sumba P.O., Dent A.E., Rochford R. Epstein–Barr virus type 2 infects T cells in healthy kenyan children. *J. Infect. Dis., 2017, vol. 216, no. 6, pp. 670–677. doi: 10.1093/infdis/jix363*
21. Coleman C.B., Lang J., Sweet L.A., Smith N.A., Freed B.M., Pan Z., Haverkos B., Pelanda R., Rochford R. Epstein–Barr virus type 2 infects T cells and induces B cell lymphomagenesis in humanized mice. *J. Virol., 2018, vol. 92, no. 21: e00813-18. doi: 10.1128/JVI.00813-18*
22. Correia S., Palser A., Elgueta Karstegl C., Middeldorp J.M., Ramayanti O., Cohen J.I., Hildesheim A., Fellner M.D., Wiels J., White R.E., Kellam P., Farrell P.J. Natural variation of Epstein–Barr virus genes, proteins, and primary microRNA. *J. Virol., 2017, vol. 91, no. 15: e00375-17. doi: 10.1128/JVI.00375-17*
23. Corvalán A.H., Ruedlinger J., de Mayo T., Polakovicova I., Gonzalez-Hormazabal P., Aguayo F. The phylogeographic diversity of EBV and admixed ancestry in the americas — another model of disrupted human-pathogen co-evolution. *Cancers (Basel)., 2019, vol. 11, no. 2, pp. 217. doi: 10.3390/cancers11020217*
24. Edwards R.H., Seillier-Moiseiwitsch F., Raab-Traub N. Signature amino acid changes in latent membrane protein 1 distinguish Epstein–Barr virus strains. *Virology, 1999, vol. 261, pp. 79–95. doi: 10.1006/viro.1999.9855*
25. Farrell P.J., White R.E. Do Epstein–Barr virus mutations and natural genome sequence variations contribute to disease? *Biomolecules, 2022, vol. 12, no. 1: 17. doi: 10.3390/biom12010017*
26. Gantuz M., Lorenzetti M.A., Chabay P.A., Preciado M.V. A novel recombinant variant of latent membrane protein 1 from Epstein–Barr virus in Argentina denotes phylogeographical association. *PLoS One, 2017, vol. 12, no. 3: e0174221. doi: 10.1371/journal.pone.0174221*
27. Hu L.-F., Zabarovsky E.R., Chen F., Cao S.-L., Ernberg I., Klein G. Winberg G. Isolation and sequencing of the Epstein–Barr virus BNLF-1 gene (LMPI) from a Chinese nasopharyngeal carcinoma. *J. Gen. Virol., 1991, vol. 72, pt. 1, pp. 2399–2409. doi: 10.1099/0022-1317-72-10-2399*
28. Hui K.F., Chan T.F., Yang W., Shen J.J., Lam K.P., Kwok H. Sham P.C., Tsao S.W., Kwong D.L., Lung M.L., Chiang A.K.S. High risk Epstein–Barr virus variants characterized by distinct polymorphisms in the EBER locus are strongly associated with nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Cancer, 2019, vol. 144, no. 12, pp. 3031–3042. doi: 10.1002/ijc.32049*
29. Ikuta K., Satoh Y., Hoshikawa Y., Sairenji T. Detection of Epstein–Barr virus in salivas and throat washings in healthy adults and children. *Microbes Infect., 2000, vol. 2, no. 2, pp. 115–120. doi: 10.1016/s1286-4579(00)00277-x*
30. Kanda T., Yajima M., Ikuta K. Epstein–Barr virus strain variation and cancer. *Cancer Sci., 2019, vol. 110, no. 4, pp. 1132–1139. doi: 10.1111/cas.13954*
31. Lay M.L., Lucas R.M., Toi C., Ratnamohan M., Ponsonby A.L., Dwyer D.E. Epstein–Barr virus genotypes and strains in central nervous system demyelinating disease and Epstein–Barr virus-related illnesses in Australia. *Intervirology, 2012, vol. 55, no. 5, pp. 372–379. doi: 10.1159/000334693*
32. Mainou B.A., Raab-Traub N. LMP1 strain variants: biological and molecular properties. *J. Virol., 2006, vol. 80, no. 13, pp. 6458–6468. doi: 10.1128/JVI.00135-06*

33. Monteiro T.A.F, Costa I.B., Costa I.B., Corrêa T.L.D.S., Coelho B.M.R., Silva A.E.S., Ramos F.L.P., Filho A.J.M., Monteiro J.L.F., Siqueira J.A.M., Gabbay Y.B., Sousa R.C.M. Genotypes of Epstein–Barr virus (EBV1/EBV2) in individuals with infectious mononucleosis in the metropolitan area of Belém, Brazil, between 2005 and 2016. *Braz. J. Infect. Dis., 2020, vol. 24, no. 4, pp. 322–329. doi: 10.1016/j.bjid.2020.06.004*
34. Neves M., Marinho-Dias J., Ribeiro J., Sousa H. Epstein–Barr virus strains and variations: geographic or disease-specific variants? *J. Med. Virol., 2017, vol. 89, no. 3, pp. 373–387. doi: 10.1002/jmv.24633*
35. Pai P.C., Tseng C.K., Chuang C.C., Wei K.C., Hao S.P., Hsueh C., Chang K.P., Tsang N.M. Polymorphism of C-terminal activation region 2 of Epstein–Barr virus latent membrane protein 1 in predicting distant failure and post-metastatic survival in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Head Neck, 2007, vol. 29, pp. 109–119. doi: 10.1002/hed.20483*
36. Palser A.L., Grayson N.E., White R.E., Corton C., Correia S., Ba Abdullah M.M., Watson S.J., Cotten M., Arrand J.R., Murray P.G., Allday M.J., Rickinson A.B., Young L.S., Farrell P.J., Kellam P. Genome diversity of Epstein–Barr virus from multiple tumor types and normal infection. *J. Virol., 2015, vol. 89, no. 10, pp. 5222–5237. doi: 10.1128/JVI.03614-14*
37. Polz D., Podsiadło Ł., Stec A., Polz-Dacewicz M. Prevalence of EBV genotypes in Polish, Taiwanese and Arabic healthy students and association between genotypes and 30-bp deletion in the LMP-1 gene phylogenetic analysis. *Pol. J. Microbiol., 2014, vol. 63, no. 1, pp. 105–109.*
38. Renzette N., Somasundaran M., Brewster F., Coderre J., Weiss E.R., McManus M., Greenough T., Tabak B., Garber M., Kowalik T.F., Luzuriaga K. Epstein–Barr virus latent membrane protein 1 genetic variability in peripheral blood B cells and oropharyngeal fluids. *J. Virol., 2014, vol. 88, no. 7, pp. 3744–3755. doi: 10.1128/JVI.03378-13*
39. Rickinson A.B., Young L.S., Rowe M. Influence of the Epstein–Barr virus nuclear antigen EBNA 2 on the growth phenotype of virus-transformed B cells. *J. Virol., 1987, vol. 61, no. 5, pp. 1310–1317. doi: 10.1128/JVI.61.5.1310-1317.1987*
40. Sitki-Green D., Covington M., Raab-Traub N. Compartmentalization and transmission of multiple Epstein–Barr virus strains in asymptomatic carriers. *J. Virol., 2003, vol. 77, no. 3, pp. 1840–1847. doi: 10.1128/jvi.77.3.1840-1847.2003*
41. Smatti M.K., Yassine H.M., AbuOdeh R., AlMarawani A., Taleb S.A., Althani A.A., Nasrallah G.K. Prevalence and molecular profiling of Epstein Barr virus (EBV) among healthy blood donors from different nationalities in Qatar. *PLoS One, 2017, vol. 12, no. 12: e0189033. doi: 10.1371/journal.pone.0189033*
42. Telford M., Hughes D.A., Juan D., Stoneking M., Navarro A., Santpere G. Expanding the geographic characterisation of Epstein–Barr virus variation through gene-based approaches. *Microorganisms, 2020, vol. 8, no. 11: 1686. doi: 10.3390/microorganisms8111686*
43. Tierney R.J., Edwards R.H., Sitki-Green D., Croom-Carter D., Roy S., Yao Q.-Y., Raab-Traub N., Rickinson A.B. Multiple Epstein–Barr virus strains in patients with infectious mononucleosis: comparison of ex vivo samples with in vitro isolates by use of heteroduplex tracking assays. *J. Infect. Dis., 2006, vol. 193, pp. 287–297. doi: 10.1086/498913*
44. Tzellos S., Farrell P.J. Epstein–Barr virus sequence variation-biology and disease. *Pathogens, 2012, vol. 1, no. 2, pp. 156–174. doi: 10.3390/pathogens1020156*
45. Vaysberg M., Hatton O., Lambert S.L., Snow A.L., Wong B., Krams S.M., Martinez O.M. Tumor-derived variants of Epstein–Barr virus latent membrane protein 1 induce sustained Erk activation and c-Fos. *J. Biol. Chem., 2008, vol. 283, no. 52, pp. 36573–36585. doi: 10.1074/jbc.M802968200*
46. Xue W.Q., Wang T.M., Huang J.W., Zhang J.B., He Y.Q., Wu Z.Y., Liao Y., Yuan L.L., Mu J., Jia W.H. A comprehensive analysis of genetic diversity of EBV reveals potential high-risk subtypes associated with nasopharyngeal carcinoma in China. *Virus Evol., 2021, vol. 7, no. 1: veab010. doi: 10.1093/ve/veab010*

Авторы:
Попкова М.И., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Уткин О.В., к.б.н., зав. лабораторией молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Брызгалова Д.А., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Сахарнов Н.А., к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Соболева Е.А., врач-инфекционист ГБУЗ НО Нижегородский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, Нижний Новгород, Россия;
Кулова Е.А., к.м.н., врач-инфекционист, аллерголог-иммунолог ООО «Тонус Кроха и Семейная Стоматология», Нижний Новгород, Россия.

Authors:
Popkova M.I., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhniy Novgorod, Russian Federation;
Utkin O.V., PhD (Biology), Head of Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhniy Novgorod, Russian Federation;
Bryzgalova D.A., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhniy Novgorod, Russian Federation;
Sakharnov N.A., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhniy Novgorod, Russian Federation;
Soboleva E.A., Infectologist, Nizhny Novgorod Regional Center for the Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases, Nizhniy Novgorod, Russian Federation;
Kulova E.A., PhD (Medicine), Infectologist, Allergologist and Immunologist, Tonus Krokha and Family Dentistry Clinic LLC, Nizhniy Novgorod, Russian Federation.

Поступила в редакцию 31.10.2022
Принята к печати 26.03.2023

Received 31.10.2022
Accepted 26.03.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 2, pp. 289–301

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 2, с. 289–301

ACINETOBACTER BAUMANNII ПРИ ИНФЕКЦИЯХ КРОВОТОКА И ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ У ДЕТЕЙ В ОТДЕЛЕНИЯХ РЕАНИМАЦИИ И ИНТЕНСИВНОЙ ТЕРАПИИ: МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

З.З. Садеева[1], И.Е. Новикова[1], Н.М. Алябьева[1], А.В. Лазарева[1], Т.М. Комягина[1], О.В. Карасева[1,2], М.Г. Вершинина[1], А.П. Фисенко[1]

[1] *ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия*
[2] *НИИ неотложной детской хирургии и травматологии Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия*

Резюме. *Acinetobacter baumannii* является представителем наиболее приоритетных нозокомиальных возбудителей, способных вызывать инфекции с высокой смертностью и экономическими затратами на лечение. Целью нашего исследования было определение роли *A. baumannii* при инфекциях кровотока и центральной нервной системы у детей. Нами проведено ретроспективное исследование *A. baumannii*-ассоциированных случаев бактериемии и инфекции ЦНС у детей. Изоляты *A. baumannii* были выделены от 17 детей, которые наблюдались с хирургической патологией (врожденные пороки сердца — 24%, абдоминальная патология — 29%, тяжелая сочетанная травма — 29%) и с соматическими заболеваниями, сопровождающимися антибактериальной и/или глюкокортикостероидной терапией — 18%. Минимальные подавляющие концентрации антибиотиков определяли методом серийных микроразведений в бульоне. Карбапенемазы выявляли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Гены биопленкообразования определяли методом полимеразной цепной реакции. Биопленки выращивали с использованием плоскодонных полистироловых планшетов с последующей окраской, фиксированием, элюированием и детекцией результатов. Популяционное разнообразие оценивали методом мультилокусного сиквенс-типирования. Около четверти случаев бактериемии и инфекции центральной нервной системы, вызванных *A. baumannii*, имели неблагоприятный исход. Резистентность к карбапенемам, аминогликозидам, фторхинолонам составила более 70%. Были определены карбапенемазы группы OXA-23 (24%) и OXA-40 (41%). Изучение продукции биопленок показало, что изоляты *A. baumannii* формировали биопленки различной интенсивности: слабые биопленки (59%), умеренные (35%) и сильные (6%). При определении чувствительности к меропенему для биопленочных и планктонных форм культур было определено, что минимальные подавляющие концентрации меропенема для биопленок были

Адрес для переписки:
Садеева Зульфиря Закиевна
119296, Россия, Москва, Ломоносовский пр., 2,
ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей МЗ РФ.
Тел.: 8 977 129-31-01. E-mail: zulfiryasadeeva@yandex.ru

Contacts:
Zulfirya Z. Sadeeva
119296, Russian Federation, Moscow, Lomonosovsky pr., 2,
National Medical Research Center for Children's Health, Ministry of Health of the Russian Federation.
Phone: 8 977 129-31-01. E-mail: zulfiryasadeeva@yandex.ru

Для цитирования:
Садеева З.З., Новикова И.Е., Алябьева Н.М., Лазарева А.В., Комягина Т.М., Карасева О.В., Вершинина М.Г., Фисенко А.П. Acinetobacter baumannii при инфекциях кровотока и центральной нервной системы у детей в отделениях реанимации и интенсивной терапии: молекулярно-генетическая характеристика и клиническая значимость // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 2. С. 289–301. doi: 10.15789/2220-7619-ABI-2091

Citation:
Sadeeva Z.Z., Novikova I.E., Alyabyeva N.M., Lazareva A.V., Komyagina T.M., Karaseva O.V., Vershinina M.G., Fisenko A.P. Acinetobacter baumannii in blood-borne and central nervous system infections in intensive care unit children: molecular and genetic characteristics and clinical significance // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 2, pp. 289–301. doi: 10.15789/2220-7619-ABI-2091

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-ABI-2091

значимо выше, чем для планктонных форм. Минимальные подавляющие концентрации меропенема для планктонных клеток распределялись от 0,5 до 512 мг/л. В то время как эти же микроорганизмы в биопленках имели минимальные подавляющие концентрации меропенема *in vitro* в концентрациях от 128 до 512 мг/л и выше. Все изоляты имели гены, регулирующие образование биопленки: *bfmR, bap* и *katE*. Ген *ompA* был обнаружен у 94% штаммов, а ген *csuA/B* — у 88%. Популяционная структура изолятов *A. baumannii*, выделенных из крови и ликвора у детей, была представлена девятью различными сиквенс-типами. Большая часть изолятов была представлена генотипами: ST944^{Oxf}, ST1550^{Oxf}, ST1104^{Oxf}, относящимися к международной клональной лини ICL6, и ST450^{Oxf}, ST2063^{Oxf} и ST1102^{Oxf} международной клональной линии ICL2. Инфекции кровотока и центральной нервной системы, ассоциированные *A. baumannii*, имеют большое значение в клинической практике. Этот микроорганизм способен длительное время сохраняться на биотических и абиотических поверхностях, обладает широкой природной и приобретенной резистентностью к антибиотикам.

Ключевые слова: *A. baumannii, инфекции кровотока, резистентность, вирулентность, нозокомиальные инфекции, летальность.*

ACINETOBACTER BAUMANNII IN BLOOD-BORNE AND CENTRAL NERVOUS SYSTEM INFECTIONS IN INTENSIVE CARE UNIT CHILDREN: MOLECULAR AND GENETIC CHARACTERISTICS AND CLINICAL SIGNIFICANCE

Sadeeva Z.Z.[a], Novikova I.E.[a], Alyabyeva N.M.[a], Lazareva A.V.[a], Komyagina T.M.[a], Karaseva O.V.[a,b], Vershinina M.G.[a], Fisenko A.P.[a]

[a] *National Medical Research Center for Children's Health, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation*

[b] *Clinical and Research Institute of Emergency Pediatric Surgery and Trauma, Department of Public Health of Moscow, Moscow, Russian Federation*

Abstract. *Acinetobacter baumannii* is a representative of the peak priority nosocomial pathogens capable of causing infections with high mortality and economic treatment costs. The purpose of our study was to determine a role of *A. baumannii* in blood-borne and central nervous system infections in children. We conducted a retrospective study of *A. baumannii* — associated cases of bacteremia and CNS infection in children. *A. baumannii* strains were isolated from 17 children followed up with surgical pathology (congenital heart defects — 24%, abdominal pathology — 29%, severe combined trauma — 29%) and with somatic diseases accompanied by antibacterial and/or glucocorticosteroid therapy — 18%. The minimum inhibitory concentrations of antibiotics were determined by the broth microdilution method. Carbapenemase genes were detected by real time polymerase chain reaction. Biofilm formation genes were determined by PCR. Biofilms were grown using flat-bottomed polystyrene tablets, followed by coloring, fixation, elution and detection. Population diversity was assessed by the multilocus sequence typing. About a quarter of cases of bacteremia and central nervous system infection caused by *A. baumannii* had an unfavorable outcome. Resistance to carbapenems, aminoglycosides, fluoroquinolones was more than 70%. Carbapenemases of the OXA-23 (24%) and OXA-40 (41%) groups were identified. The study of biofilm production showed that *A. baumannii* isolates formed biofilms of varying intensity: weak biofilms (59%), moderate (35%) and strong (6%). During determining the sensitivity to meropenem for biofilm and planktonic forms of cultures, it was determined that the minimum inhibitory concentrations of meropenem were significantly higher for biofilms than for planktonic forms. The minimum inhibitory concentrations of meropenem for plankton cells ranged from 0.5 to 512 mg/l. While in biofilms the same microorganisms had *in vitro* minimum inhibitory concentrations of meropenem within 128 to 512 mg/l and higher. All isolates bore biofilm formation regulating genes: *bfmR, bap* and *katE*. The *ompA* gene was found in 94% strains, and the *csuA/B* gene was found in 88%. The population pattern of *A. baumannii* isolated from blood and cerebrospinal fluid of children was represented by nine different sequence types. Most of the isolates were represented by genotypes: ST944^{Oxf}, ST1550^{Oxf}, ST1104^{Oxf} belonging to the international clonal line ICL6, and ST450^{Oxf}, ST2063^{Oxf} and ST1102^{Oxf} of the international clonal line ICL2. Blood-borne and central nervous system infections associated with *A. baumannii* have a great importance in clinical practice. This microorganism is able to persist for a long time on biotic and abiotic surfaces, has a wide natural and acquired antibiotics resistance.

Key words: *A. baumannii, bloodstream infections, resistance, virulence, nosocomial infections, lethality.*

Введение

Acinetobacter baumannii вызывает различные госпитальные инфекции во всем мире. Представители рода *Acinetobacter* признаны одними из наиболее приоритетных нозокомиальных возбудителей, вызывающих инфекции с высокими показателями смертности и экономическими затратами на лечение [40, 47].

Внутрибольничные инфекции, ассоциированные с *A. baumannii*, стали актуальной проблемой для здравоохранения во многих странах. Этот патоген способен вызывать различные инфекции, такие как бактериемия, эн-

докардит, пневмония, менингит, раневые инфекции и инфекции мочевыводящего тракта [4, 35, 55]. Особенно настораживает тот факт, что в последние годы продолжает увеличиваться частота инфицирования кровотока грамотрицательными неферментирующими бактериями, в том числе множественно-резистентными изолятами *A. baumannii* [58].

A. baumannii является проблемным патогеном за счет широкого арсенала механизмов лекарственной устойчивости и высокой способности к ее приобретению [10, 22, 28, 33, 36, 39, 42].

Эти механизмы включают ферментативное разрушение антибиотиков, изменение проницаемости бактериальной клетки, активное выведение антибиотика и модификацию целевых участков [8, 28, 36, 43, 44]. Различают изоляты *A. baumannii* с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ; резистентность как минимум к трем классам противомикробных препаратов), с широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ; устойчивость к пяти классам противомикробных препаратов, включая карбапенемы) [17], в настоящее время в стационарах часто выделяют изоляты, резистентные к полимиксинам, что значительно затрудняет лечение [22, 34, 39, 41, 49].

Способность этого возбудителя сохраняться в различных условиях, в том числе при высушивании, приводит к сохранению его жизнеспособности во внутрибольничной среде до нескольких месяцев [15]. Образование биопленок на биотических и абиотических поверхностях также сохраняет жизнеспособность этого патогена [27]. Для нозокомиальных инфекций способность к образованию биопленок играет особую роль, поскольку это позволяет им колонизировать различные рабочие поверхности, медицинские устройства и аппаратуру [3, 21].

A. baumannii обладает регуляторной системой, включающей белок наружной мембраны *(ompA)*, пили *(csu)*, белки, ассоциированные с биопленкой *(bap)*, каталазу *(katE)* [38]. Эта система поддерживает и регулирует проявление вирулентности, а именно: чувство кворума, образование биопленки, подвижность, адгезию и продукцию каталазы. Факторы вирулентности играют значительную роль при терапии *A. baumannii*, потому как наличие биопленки может затруднять проникновение антибиотиков к микробной клетке, вследствие чего, происходит увеличение минимальных ингибирующих концентраций антибактериальных препаратов [13]. Продукция каталазы микробной клеткой способствует разрушению активных форм кислорода, которые вырабатываются нейтрофилами хозяина при инфицировании, что вносит существенный вклад в патогенез инфекции [50]. Вирулентные свойства помогают патогену сохраняться в организме хозяина, скрываться от его иммунной системы и проявлять свою патогенность [7, 14].

Сложная таксономия бактерий рода *Acinetobacter* связана с высоким потенциалом генетической изменчивости [13]. В настоящее время существует более 2800 вариантов последовательностей MLST (ST), внесенных в базу данных MLST *A. baumannii* (https://pubmlst.org/organisms/acinetobacter-baumannii). Недавний анализ показал наличие шести основных крупных международных клональных линий, распространенных на всех континентах [26]. Эти международные клональные линии включают три основных первоначальных эпидемических клона и отражают появление новых клонов эпидемического риска [12].

A. baumannii, обладающий МЛУ и ШЛУ, а также рядом патогенных свойств, способен вызывать тяжелые инфекционные осложнения у пациентов в отделениях реанимации и интенсивной терапии, нередко приводя к неблагоприятным исходам [11].

Целью нашего исследования было изучение резистентности, патогенности и клонального разнообразия *A. baumannii* при инфекциях кровотока и ЦНС у детей.

Материалы и методы

Бактериальные культуры. В период с 2014 по 2021 г. были отобраны 17 изолятов *A. baumannii* из положительных гемокультур и проб ликвора. Изоляты были выделены от пациентов из двух московских детских больниц: ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России (С1), НИИ неотложной детской хирургии и травматологии Департамента здравоохранения г. Москвы (С2).

Образцы крови инкубировали в анализаторе гемокультур BACTEC 9050 (Becton Dickinson, США), BacT/ALERT (bioMerieux, Франция) до фиксации роста микроорганизмов, затем пробу отсевали на плотные питательные среды для выделения чистой культуры возбудителя. Посевы производили на питательные среды: кровяной агар и Uri-select агар (BioRad, США), затем инкубировали в термостате при температуре 37°С в течение 24–48 ч. Идентификацию возбудителя проводили методом масс-спектрометрии MALDI-ToF (Bruker Daltonics, Германия).

Чувствительность к антибактериальным препаратам. Для определения чувствительности к антибиотикам использовали: меропенем, имипенем, колистин, тобрамицин, амикацин, гентамицин, триметоприм/сульфаметоксазол, ципрофлоксацин, левофлоксацин. МПК антибиотиков определяли методом серийных микроразведений в бульоне Мюллера–Хинтон

(bioMerieux, Франция), Sensititre™ (ThermoScientific, Великобритания). В качестве контроля использовали штамм *A. baumannii* ATCC 19606.

Минимальные подавляющие концентрации (МПК) к меропенему определяли методом микроразведений в соответствии со стандартом (ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010).

Результаты интерпретировали в соответствии с критериями Европейского комитета по тестированию чувствительности к антибиотикам (EUCAST) версия 10.0. (EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, version 10.0., 2020, pp. 10–20).

Выделение ДНК и определение генов карбапенемаз. Для выделения ДНК использовали суточную культуру. Бактериальную ДНК выделяли согласно инструкции производителя с использованием коммерческих наборов «ГК-экспресс» (ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Полученные образцы хранили до использования при температуре –20°С.

Выявление генов, отвечающих за продукцию карбапенемаз, проводили с использованием наборов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс MDR Ab-OXA-FL» (OXA-23, OXA-40, OXA-58, OXA-51), «АмплиСенс MDR MBL-FL» (IMP, NDM, VIM), производства ЦНИИЭ Роспотребнадзора. Проведение ПЦР осуществляли согласно инструкции производителя. ПЦР проводили с помощью амплификатора LightCycler 96 (Roche). Результаты оценивали по наличию или отсутствию пересечения графика флуоресценции с пороговой линией, отражающей экспоненциальный подъем сигнала. При значении Ct ≤ 32 результат оценивали как положительный.

Биопленкообразование. Анализ формирования биопленок на абиотической поверхности проводили с использованием сердечно-мозгового бульона (BHB; Becton Dickinson, США) по ранее описанной методике с модификациями [20].

Биопленки выращивали в 96-ти луночных полистироловых планшетах с плоским дном. Все изоляты тестировали в трех повторах. Для исследования использовались суточные бактериальные культуры. Аликвоту 20 мкл бактериальной суспензии с мутностью 0,8 по МакФарланду вносили в лунки, содержащие 180 мкл BHB. Инкубировали в течение 24 ч при температуре 37°С без перемешивания. После инкубации бульон и планктонные клетки тщательно отбирали, лунки промывали дистиллированной водой. Для фиксации биопленок добавляли 200 мкл 2,5% глутарового альдегида и инкубировали 5 мин при комнатной температуре. После удаления альдегида лунки трижды промывали дистиллированной водой. Для окрашивания вносили 200 мкл кристаллического фиолетового (0,1% спиртовой раствор), инкубировали в течение 10 мин. После удаления красителя лунки трижды промывали дистиллированной водой. Для растворения и обесцвечивания связанного красителя добавляли 200 мкл 95% этанола с последующей инкубацией в течение 30 мин. Оптическую плотность итогового раствора измеряли при длине волны 590 нм с использованием планшетного считывателя Infinite 200M (Tecan, Австрия). Результаты интерпретировали согласно рекомендациям [51].

Чувствительность биопленочных культур к меропенему определяли на суточных биопленках. После тщательного отбора бульона и планктонных форм в лунки добавляли растворы антибиотика с концентрацией от 0,5 до 512 мг/л (аналогично определению МПК меропенема для планктонных форм) и инкубировали в течение 24 ч при температуре 37°С без перемешивания. Учет результатов проводили по полному отсутствию роста микроорганизма в лунке.

Гены вирулентности. Гены *bfmR, csuA/B, ompA, bap, katE*, отвечающие за чувство кворума и процесс образования биопленок, определяли методом ПЦР с детекцией в 2% агарозном геле. Праймеры и температуры отжига представлены в табл. 1.

Условия и объемы реакции

Для генов *bfmR, csuA/B, ompA, katE*: компоненты ПЦР смеси — iTaq Universal Probes Supermix, BioRad — 5 мкл; по 1 мкл каждого праймера (F и R); деионизированная вода — 1 мкл; проба ДНК — 2 мкл.

Условия ПЦР реакции:

– Начальная денатурация — 95°С — 5′;
– Денатурация 94°С — 60″;
– Отжиг праймеров от 57 до 62°С (см. табл. 1) — 60″;
– Элонгация 72°С — 60″;
– Количество температурных циклов — 35;
– Заключительный этап элонгации 72°С — 5′.

Для гена *bap*: компоненты ПЦР смеси — iQ Supermix, BioRad — 5 мкл; по 1 мкл каждого праймера (F и R); деионизированная вода — 1 мкл; проба ДНК — 2 мкл.

Условия ПЦР реакции:

– Начальная денатурация — 95°С — 5′;
– Денатурация 95°С — 30″;
– Отжиг праймеров 54°С — 30″;
– Элонгация 72°С — 45″;
– Количество температурных циклов — 35;
– Заключительный этап элонгации 72°С — 10′.

ПЦР выполняли с использованием амплификатора LightCycler 96 (Roche, Швейцария); 5 мкл всех продуктов ПЦР подвергали электрофорезу в 1,5% агарозном геле в буфере TBE при 120 В и визуализировали в УФ-свете путем окрашивания бромидом этидия.

Мультилокусное секвенс-типирование (МЛСТ). Для сиквенс-типирования изолятов *A. baumannii* использовали метод МЛСТ. Подготовка включала

Таблица 1. Праймеры для определения генов, отвечающих за продукцию биопленки
Table 1. Primer sequences for determining the genes responsible for biofilm production

Ген Gene	Последовательность 5′→3′ Primer sequence (5′→3′)		Продукт Size (bp)	Температура отжига (°C) Annealing temperature (°C)	Источник References
bfmR	Bfm-f	CTGGTAGGTAATCAGTTCG	200	62	[53]
	Bfm-r	GAGAGACCCAAACCATAACC			
csuA/B	Csu-f	ATGCGGTAAATACTCAAGCA	204	57	[53]
	Csu-r	TCACAGAAATATTGCCACCT			
ompA	Omp-f	CTCTTGCTGGCTTAAACGTA	192	57	[53]
	Omp-r	GCAATTTCTGGGCTTGTATTG			
katE	Kat-f	GTGTCCGGTTCAGGTTTTAC	230	60	[53]
	Kat-r	GGATTCTTGACAGACCCAAC			
bap	Bap-f	ATGCCTGAGATACAAATTATTGCCAAGGATAATC	561	54	[27]
	Bap-r	AGGTGCTGAAGAATCATCATTAC			

амплификацию участков семи генов домашнего хозяйства: *gltA, gyrB, gdhB, recA, cpn60, gpi, rpoD.* Были использованы праймеры из общепринятой схемы МЛСТ Oxford [6].

Подготовку ампликонов осуществляли с помощью стандартных методик. Секвенирование проводили с использованием наборов реагентов и оборудования фирмы Applied Biosystems (США) в соответствии с рекомендациями производителя. Нуклеотидные последовательности, полученные в результате секвенирования, анализировали с помощью программы SeqMan (DNASTAR Inc.) и затем сравнивали с базой аллелей МЛСТ [https://pubmlst.org/organisms/acinetobacter-baumannii (02.12.2022)]. Генотип определяли по комбинации аллелей.

Оценка клинических данных. Ретроспективно были проанализированы клинические данные пациентов, из крови или ликвора которых был выделен *A. baumannii.*

Статистические методы. Статистическую обработку данных проводили с помощью программ SPSS 20.0 (SPSS Statistics, США) и Microsoft Excel. Различия считались статистически значимыми при $p \leq 0{,}05$.

Результаты

За исследуемый период было выделено 17 изолятов *A. baumannii* из положительных проб гемокультур и ликвора. При этом из крови было выделено 14 (82%) изолятов, а из ликвора — 3 (18%).

Результаты определения чувствительности к антимикробным препаратам представлены на рис. 1.

Среди изученных штаммов *A. baumannii* выявлено довольно широкое распространение антибиотикорезистентности. Только для колистина количество чувствительных изолятов превышает количество резистентных — 76% (13/17).

Для карбапенемов резистентность составила 76% (n = 13). К аминогликозидам резистентность проявили от 71 до 88% изолятов. К фторхинолонам были резистентны 88% (n = 15) штаммов. К бисептолу проявили резистентность чуть более половины изолятов — 59% (n = 10).

В нашем исследовании у штаммов *A. baumannii* были выявлены гены карбапенемаз OXA-23 и OXA-40. Видоспецифическая карбапенемаза OXA-51 была обнаружена у всех изученных

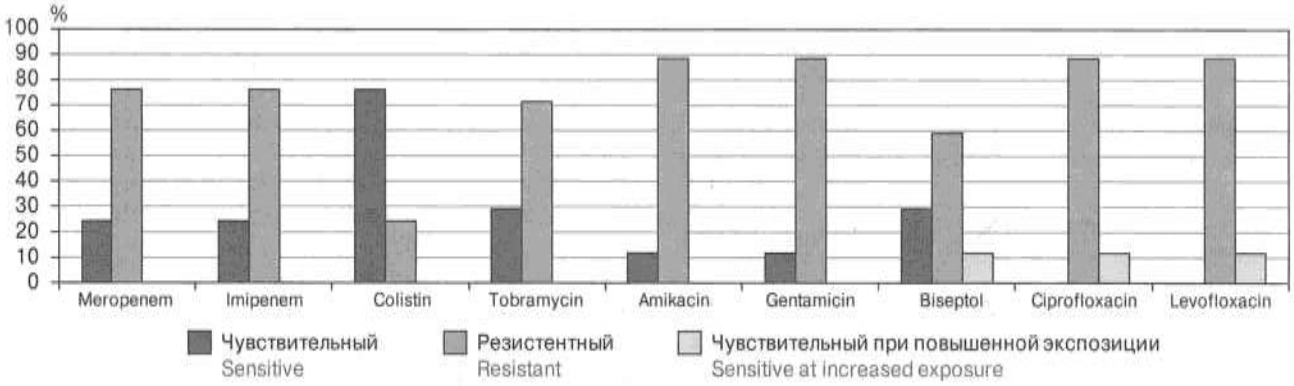


Рисунок 1. Чувствительность к антимикробным препаратам изолятов *A. baumannii*
Figure 1. Sensitivity to antimicrobial drugs in *A. baumannii* isolates

изолятов. Карбапенемаза OXA-58, комбинации карбапенемаз и металло-β-лактамазы IMP, NDM, VIM у исследованных штаммов обнаружены не были. Для оценки частоты выявления карбапенемаз сравнивали два временных периода — с 2014 по 2017 г. и с 2018 по 2021 г. Также продукция карбапенемаз сравнивалась между изолятами, выделенными в двух стационарах.

Карбапенемазы группы OXA-23 были выявлены у 24% (n = 4) штаммов. При этом в период с 2018 по 2021 г. эта группа карбапенемаз выявлялась значимо чаще, чем с 2014 по 2017 г. (p = 0,0294). Значимых различий между двумя стационарами по наличию у изолятов этой группы карбапенемаз выявлено не было. Карбапенемазы группы OXA-40 были выявлены у 41% (n = 7) штаммов. Значимых различий между более ранними и более поздними изученными периодами с 2014 по 2021 г. выявлено не было. В то же время в стационаре C1 эта группа карбапенемаз выявлялась значительно чаще, чем в стационаре C2 (p = 0,02098). У двух изолятов, резистентных к карбапенемам, не было выявлено карбапенемаз.

Изучение продукции биопленок показало, что изоляты *A. baumannii* проявляли способность к формированию биопленок различной интенсивности: слабые биопленки (59%), умеренные (35%) и сильные (6%).

Для биопленочных культур была определена чувствительность к меропенему. Результаты сравнения МПК меропенема планктонных и биопленочных культур отражены на рис. 2.

Статистический анализ показал, что МПК меропенема для биопленочных форм культур значимо выше, чем МПК меропенема для планктонных форм тех же штаммов ($p < 0,05$). МПК меропенема для планктонных клеток распределялись от 0,5 до 512 мг/л, в то время как эти же микроорганизмы в биопленках имели МПК меропенема *in vitro* в концентрациях от 128 до 512 мг/л и выше. Было определено, что у изолятов, проявлявших способность к образованию слабых биопленок, МПК меропенема для бактериальных клеток в составе биопленок превышали МПК для планктонных клеток от двух до восьми раз. Для штаммов, способных к образованию умеренных и сильных биопленок превышение подавляющих концентраций достигало 512 раз (0,5 мг/л для планктонных и 256 мг/л для клеток в составе биопленок).

Для всех штаммов было проведено определение генов *bfmR, csuA/B, ompA, bap* и *katE*, ответственных за регуляцию биопленкообразования. Результаты представлены в табл. 2.

Все изоляты имели гены *bfmR, bap* и *katE*. Ген *ompA* был обнаружен у 94% (n = 16) штаммов, а ген *csuA/B* — у 88% (n = 15).

Популяционная структура изолятов *A. baumannii*, выделенных из крови и ликвора у детей, представлена девятью различными сиквенс-типами. Один из них ранее не был представлен в базе данных МЛСТ (рис. 3).

Сиквенс-типы ST944^{Oxf}, ST1550^{Oxf} и ST1104^{Oxf} входят в клональную группу CC944^{Oxf}/CC78Pas международной клональной линии ICL6, а сиквенс-типы ST450^{Oxf}, ST2063^{Oxf} и ST1102^{Oxf} — в клональную группу CC92/CC208^{Oxf}/CC2Pas, относящуюся к международной клональной линии ICL2.

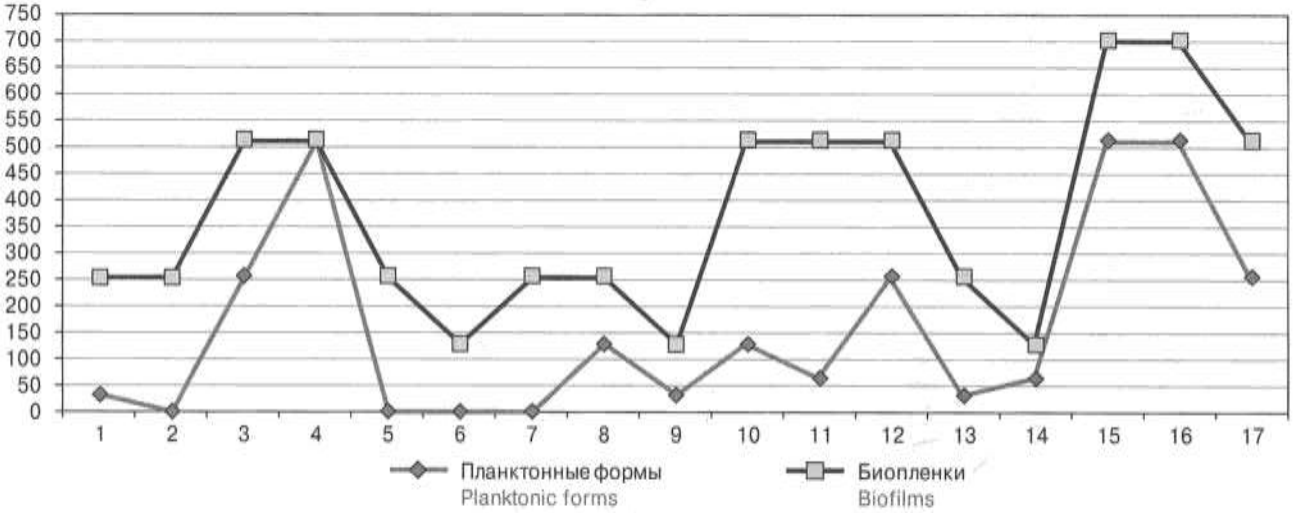


Рисунок 2. Сравнение МПК меропенема для планктонных и биопленочных культур *A. baumannii*

Figure 2. Comparison of the MIC of meropenem for planktonic and biofilm *A. baumannii* cultures

Примечание. Для двух изолятов под номерами 15 и 16 МПК меропенема была определена более 512 мг/л; на рисунке эти точки имеют значения 700 мг/л. Ось X — порядковые номера изолятов. Ось Y — значения МПК меропенема.

Note. For isolate 15 and 16, the MIC of meropenem was determined to be more than 512 mg/l; in the figure, these points have values of 700 mg/l. X-axis: ordinal number of isolates. Y-axis: values of the MIC of meropenem.

Таблица 2. Наличие генов биопленкообразования у штаммов *A. baumannii*
Table 2. Presence of biofilm formation genes in *A. baumannii* strains

Интенсивность биопленки Biofilm intensity	Гены, ассоциированные с образованием биопленок Genes associated with biofilm formation				
	bfmR	*csuA/B*	*ompA*	*bap*	*katE*
Слабая/Weak **(n = 10)**	10	9	9	10	10
Умеренная/Moderate **(n = 6)**	6	5	6	6	6
Сильная/Strong **(n = 1)**	1	1	1	1	1

Генотипы ST944^{Oxf}, ST1127^{Oxf}, ST1104^{Oxf}, ST1550^{Oxf}, ST450^{Oxf}, ST2419^{Oxf} встречались только в С1, генотип ST2063^{Oxf} — только в С2, а генотипы ST1100^{Oxf} и ST1102^{Oxf} выделялись в обоих стационарах с одинаковой частотой.

Продуцентами карбапенемаз группы OXA-40 были все представители ST944^{Oxf}, ST1104^{Oxf}, ST1550^{Oxf} (ICL6), а также карбапенем-резистентный представитель ST450^{Oxf}. Карбапенемазы группы OXA-23 были выявлены у всех изолятов ST1102^{Oxf} и ST2063^{Oxf} (ICL2).

Способностью к образованию сильной биопленки обладал только изолят с новым генотипом ST2419^{Oxf}. Умеренные биопленки образовывали все изоляты ST450^{Oxf}, ST1102^{Oxf} и ST1127^{Oxf}. Все штаммы ST944^{Oxf}, ST1100^{Oxf}, ST1104^{Oxf}, ST1550^{Oxf} и ST2063^{Oxf} обладали слабой способностью к биопленкообразованию.

Гены, отвечающие за образование биопленок, встречались у представителей всех девяти генотипов. В трех случаях у изолятов отсутствовали некоторые из них: *csuA/B* отсутствовал у изолятов генотипов ST1127^{Oxf} и ST2063^{Oxf}, *ompA* отсутствовал у другого представителя ST2063^{Oxf}.

Среди изученных 17 штаммов по итогам анализа стоит отметить четыре, которые проявили устойчивость ко всем используемым в тестировании антибиотикам. Сводные данные по этим образцам представлены в табл. 3.

По результатам оценки клинических данных изоляты *A. baumannii* были выделены от детей в возрасте от 5 суток до 17 лет. Медиана возраста — 11 месяцев (5 месяцев; 7 лет 3 месяца). Пациенты были разделены на 4 возрастные группы: I (0–1 год) — 9 детей (53%), II (1–3 лет) — 2 ребенка (12%), III (3–7 лет) — 1 ребенок (6%), IV (7–17 лет) — 5 детей (29%). Характеристика изолятов, выделенных в разных возрастных группах, отображена в табл. 4.

Изоляты *A. baumannii* были выделены у детей, которые наблюдались с хирургической патологией (врожденные пороки сердца — 24%, абдоминальная патология — 29%, тяжелая сочетанная травма — 29%) и с соматическими заболеваниями, сопровождающимися антибактериальной и/или глюкокортикостероидной терапией — 18%.

Из 14 пациентов, от которых была получена положительная гемокультура, диагноз сепсис был у четверых (29%), три случая завершились летально.

В трех случаях положительные высевы *A. baumannii* были получены из образцов ликвора. При этом у двух пациентов стоял диагноз вентрикуломенингит, в одном случае был зафиксирован летальный исход.

Микробиологическая и клиническая характеристика неблагоприятных исходов отображена в табл. 5.

В трех эпизодах бактериемии с неблагоприятным исходом, ассоциированной *A. baumannii*, возраст пациентов был меньше года, сепсис у них развился на фоне хирургической патологии. Выделенные изоляты *A. baumannii* проявляли резистентность минимум к трем группам препаратов (карбапенемы, аминогликозиды и фторхинолоны) и обладали карбапенемазой группы OXA-40. Один из описанных штаммов проявлял устойчивость ко всем исследованным антимикробным препаратам (в том числе к колистину и бисептолу). В двух случаях ми-

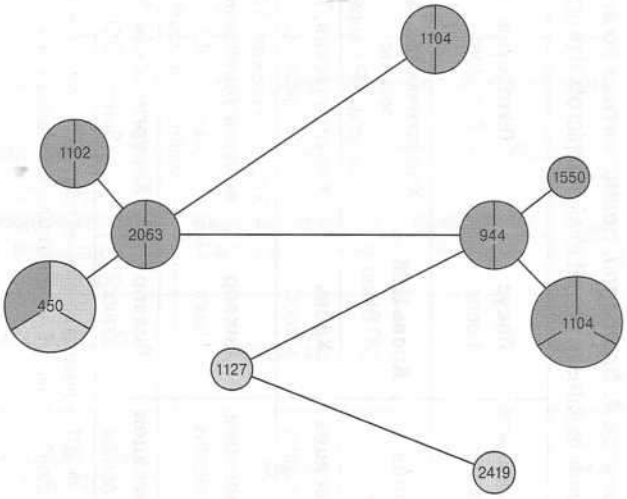


Рисунок 3. Генотипическая структура изолятов *A. baumannii*, выделенных из крови и ликвора у детей

Figure 3. Genotypic pattern of *A. baumannii* isolates obtained from blood and cerebrospinal fluid of children

Примечание. Темным цветом обозначены изоляты, резистентные к карбапенемам, светлым — чувствительные. Секторами обозначено количество изолятов в генотипе.

Note. Dark and light color indicates isolates resistant or sensitive to carbapenems, respectively. Sectors indicate the number of isolates in the genotype.

Таблица 3. Характеристика изолятов *A. baumannii*, резистентных ко всем исследованным антимикробным препаратам

Table 3. Characteristics of *A. baumannii* isolates resistant to all antimicrobial drugs studied

Номер изолята Isolate number	Стационар Hospital	Возраст пациента Patient's age	Локус Locus	Патология Pathology	МПК меропенема MIC of meropenem	МПК колистина MIC of colistin	Карбапенемазы Carbapenemases	Биопленка Biofilm	ST
56–1520	C1	**7 месяцев** 7 months	**Кровь ЦВК** CVC Blood	**Хирургическая, АП + сепсис** Surgical, AP + sepsis	512	8	OXA-40	L	944
99–738	C2	**7 лет 3 месяцев** 7 years 3 months	**Кровь** Blood	**Хирургическая, ТСТ** Surgical, SCI	64	8	OXA-23	L	2063
99–974	C2	**11 лет 8 месяцев** 11 years 8 months	**Ликвор** Liquor	**Хирургическая, ТСТ + вентрикуломенингит** Surgical, SCI + ventriculomeningitis	256	4	OXA-23	L	2063
99–1128	C2	**2 года 8 месяцев** 2 years 8 months	**Ликвор** Liquor	**Хирургическая, ТСТ** Surgical, SCI	32	4	OXA-23	M	1102

Примечание. АП — абдоминальная патология, ТСТ — тяжелая сочетанная травма, L — слабая биопленка, M — умеренная биопленка, ST — сиквенс-тип.

Note. AP — abdominal pathology, SCI — severe combined injury, L — weak biofilm, M — moderate biofilm, ST — sequenstype

кроорганизмы обладали слабой способностью к образованию биопленок, в одном — умеренной. В одном случае *A. baumannii* определялся в пробе ликвора 17-летнего пациента, у которого вентрикуломенингит развился на фоне хирургической патологии.

Изолят ацинетобактера, выделенный в этом случае, проявлял устойчивость к карбапенемам, аминогликозидам, фторхинолонам и бисептолу, не имел карбапенемаз и обладал слабой способностью к биопленкообразованию. Во всех случаях, закончившихся летально, были определены разные сиквенс-типы *A. baumannii*: ST1104, ST1100, ST944, ST450.

Обсуждение

Результаты этого исследования отражают серьезную проблему, которую представляют собой инфекции кровотока и ЦНС, вызванные множественно-резистентными изолятами *A. baumannii*. Более половины исследованных нами штаммов ацинетобактера проявили резистентность к трем и более классов антибиотиков. Около четверти изолятов проявили резистентность ко всем исследованным антибиотикам, в том числе к колистину. Эта тенденция не может не вызывать опасений по поводу дальнейших перспектив в лечении инфекций, вызванных нозокомиальными штаммами *A. baumannii*. Наши данные по резистентности в отношении большинства групп препаратов совпадают с результатами многоцентрового исследования наших турецких коллег, у которых резистентность к этим же группам препаратов составила более 90%. В то же время резистентность к колистину в данном исследовании значительно ниже, чем в нашем — около 1% [9]. Резистентность к карбапенемным антибиотикам в нашем исследовании сопоставима с данными многоцентрового исследования «МАРАФОН 2015–2016» и составила около 70% [1].

Гены OXA-51 встречаются в природе в геноме *A. baumannii*, недавно они были обнаружены у других представителей рода *Acinetobacter*, проявляющих устойчивость к карбапенемам. Обнаружение OXA-51-подобного гена может быть использовано в качестве дополнительной идентификации *A. baumannii* до вида [29]. У всех исследованных нами изолятов ацинетобактера был обнаружен OXA-51-подобный ген.

По данным зарубежных коллег, у ацинетобактера часто встречаются металло-β-лактамазы [24], однако в нашем исследовании резистентность к карбапенемам была связана с наличием карбапенемаз группы D (OXA-23 подобные и OXA-40 подобные). В отличие от результатов китайских [30] и немецких коллег [48], в нашем исследовании преобладают

OXA-40-подобные карбапенемазы (41%), OXA-23-подобных обнаружено только 24%. В то же время наши данные по распространенности карбапенемаз согласуются с результатами, полученными коллегами из Польши [37], Испании [54] и России [1].

Среди множества факторов вирулентности способность к образованию биопленок — одна из основных, определяющих патогенность *A. baumannii* [32]. Все изоляты ацинетобактера, выделенные из крови и ликвора, в нашем исследовании способны к образованию биопленок разной интенсивности, что соотносится с предыдущими данными [23].

Обычно клинические штаммы *A. baumannii* образуют сильные биопленки [45, 57]. Для изученных нами штаммов было характерно образование биопленок слабой интенсивности. Наличие генов, ответственных за продукцию биопленок, согласно предыдущим исследованиям, коррелирует с интенсивностью биопленкообразования [5, 7]. Несмотря на наличие практически у всех изученных нами штаммов четырех и более генов, отвечающих за биопленкоообразование *(bfmR, csuA/B, ompA, bap, katE)*, менее половины изолятов оказались способны к образованию сильных и умеренных биопленок (7/17).

Таблица 4. Характеристика изолятов *A. baumannii* в разных возрастных группах

Table 4. Characteristics of *A. baumannii* isolates in different age groups

Параметры Parameters	**Группы** Groups	**Группа 1: дети до 1 года** Group 1: children under 1 year **(n = 9)**	**Группа 2: от 1 до 3 лет** Group 2: from 1 to 3 years **(n = 2)**	**Группа 3: от 3 до 7 лет** Group 3: from 3 to 7 years **(n = 1)**	**Группа 4: от 7 до 17 лет** Group 4: from 7 to 17 years **(n = 5)**
Карбапенемазы Carbapenemases	**OXA-23**	–	2	–	2
	OXA-40	5	–	–	2
Интенсивность биопленок Biofilm intensity	**Слабая**/Weak	5	–	–	5
	Умеренная/Moderate	4	2	–	–
	Сильная/Strong	–	–	1	–
Генотипы (STOxf) Genotypes (STOxf)		450 (n = 3) 944 (n = 2) 1104 (n = 2) 1127 1100	1102 (n = 2)	2419	1100 1104 1550 2063 (n = 2)

Таблица 5. Характеристика случаев бактериемии и инфекции ЦНС, ассоциированных с *A. baumannii*, с летальным исходом

Table 5. Characteristics of bacteremia and CNS infection cases associated with *A. baumannii*, with lethal outcome

Номер изолята Isolate number	**Возраст пациента** Patient's age	**Локус** Locus	**Патология** Pathology	**Фенотип резистентности** Resistance phenotype	**Карбапенемазы** Carbapenemases	**Биопленки** Biofilms	**ST**
46-3145	**1 месяц** 1 month	**Кровь ЦВК** CVC Blood	**Хирургическая, ВПС + сепсис** Surgical, CHD + sepsis	**CAR, AMI, FQL, STX**	**OXA-40**	**L**	**1104**
56-1520	**7 месяцев** 7 months	**Кровь ЦВК** CVC Blood	**Хирургическая, АП + сепсис** Surgical, AP + sepsis	**CAR, AMI, FQL, STX, COL**	**OXA-40**	**L**	**944**
79-784	**17 лет** 17 years	**Ликвор** Liquor	**Хирургическая, ТСТ + вентрикуломенингит** Surgical, SCI + ventriculomeningitis	**CAR, AMI, FQL, STX**	**–**	**L**	**1100**
87-190	**8 месяцев** 8 months	**Кровь** Blood	**Хирургическая, ВПС + сепсис** Surgical, CHD + sepsis	**CAR, AMI, FQL**	**OXA-40**	**M**	**450**

Примечание. ВПС — врожденный порок сердца, АП — абдоминальная патология, ТСТ — тяжелая сочетанная травма, L — слабая биопленка, M — умеренная биопленка, CAR — карбапенемы, AMI — аминогликозиды, FQL — фторхинолоны, STX — триметоприм/сульфаметоксазол, COL — колистин, ST — сиквенс-тип.

Note. CHD — congenital heart disease, AP — abdominal pathology, SCI — severe combined injury, L — weak biofilm, M — moderate biofilm, CAR — carbapenems, AMI — aminoglycosides, FQL — fluoroquinolones, STX — trimethoprim/sulfamethoxazole, COL — colistin, ST — sequence type.

Основная масса генотипов, полученных в нашем исследовании, относится к двум международным клональным линиям высокого риска ICL2 и ICL6. Это согласуется с предыдущими исследованиями наших российских коллег [1]. По данным базы МЛСТ, генотипический состав *A. baumannii*, выделенных из крови и ликвора в нашем исследовании, значительно отличается от такового в Китае, Японии [25], Дании [19].

Описывается, что штаммы международной клональной группы CC92/CC208^{Oxf}/CC2Pas (ICL2) наиболее часто способны вызывать бактериемию у пациентов [18]. В нашем исследовании к клональной линии ICL2 относились 7 изолятов (41%).

Acinetobacter spp. чаще всего вызывает инфицирование пациентов, подвергшихся инвазивным вмешательствам (катетеризация, интубация трахеи), имеющих травматическое или хирургическое повреждение кожных покровов, длительно применявших антимикробные препараты широкого спектра действия, особенно пациентов с травмами и в отделениях интенсивной терапии [16]. Наиболее распространенными инфекциями, связанными с *A. baumannii*, в клинике являются нозокомиальная пневмония и бактериемия. Фактором, провоцирующим возникновение пневмоний, может быть наличие у пациентов эндотрахеальных трубок и высокая способность *A. baumannii* к их колонизации [52]. Инфекции кровотока, как правило, связаны с наличием центрального венозного катетера или очагов инфекции, способствующих диссеминации патогена [2]. Менингиты, ассоциированные *A. baumannii*, обычно возникают после операций или при наличии вентрикулостомы [56].

В нашем исследовании наблюдались пациенты с хирургической патологией (53%), с тяжелыми сочетанными травмами (29%), а также с соматическими заболеваниями, сопровождающимися длительной антибактериальной и/или глюкокортикостероидной терапией (18%). Во всех случаях они находились в отделении реанимации и интенсивной терапии.

Сообщается, что уровень смертности при инфекциях кровотока, ассоциированных *A. baumannii*, колеблется от 28 до 43% [11]. В то же время данные некоторых исследователей еще более тревожны: свыше 60% в Израиле [46] и Бразилии [31]. В нашем исследовании около четверти случаев бактериемии и инфекции ЦНС, вызванных *A. baumannii*, имели неблагоприятный исход.

Выводы

Проведенный анализ показал, что инфекции кровотока и ЦНС, ассоциированные с *A. baumannii*, имеют большое значение особенно в отделениях реанимации и интенсивной терапии. *A. baumannii* способен длительное время сохраняться в организме человека и на поверхностях окружающей среды, в первую очередь больничной, а также обладает огромным потенциалом антибиотикорезистентности и вирулентности, способствуя высокой заболеваемости и смертности пациентов.

Список литературы/References

1. Шек Е.А., Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Склеенова Е.Ю., Иванчик Н.В., Шайдуллина Э.Р., Кузьменков А.Ю., Дехнич А.В., Козлов Р.С., Семенова Н.В., Слепакова С.А., Шепотайлова Н.В., Стребкова В.В., Рыбина Н.А., Яранцева Н.З., Перевалова Е.Ю., Розанова С.М., Наговицина С.Г., Молдовану М.Г., Насыбуллова З.З., Архипенко М.В., Шахмурадян Р.М., Нижегородцева И.А., Варибрус Е.В., Александрова И.А., Лазарева А.В., Крыжановская О.А., Маркелова Н.Н., Чернявская Ю.Л., Лебедева Е.В., Кириллова Г.Ш., Беккер Г.Г., Попова Л.Д., Елохина Е.В., Смолькова Ю.Е., Зиновьев Д.Ю., Итяева Л.Н., Блинова Г.Ю., Зубарева Н.А., Витязева В.П., Плаксина М.Г., Куцевалова О.Ю., Панова Н.И., Суборова Т.Н., Полухина О.В., Ворошилова Т.М., Чурикова Е.М., Москвитина Е.Н., Кречикова О.И., Петрова Т.А., Мартьянова Н.М., Хохлова К.О., Гудкова Л.В., Быконя С.А., Хохлявина Р.М., Шпилькина Л.В., Бурасова Е.Г., Хребтовская В.А., Молчанова И.В., Звонарева О.В., Корнилова П.А., Крянга В.Г., Портнягина У.С., Шамаева С.Х., Попов Д.А., Вострикова Т.Ю. Устойчивость к антибиотикам, образование карбапенемаз и генотипы внутрибольничных штаммов Acinetobacter spp. в больницах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН 2015–2016»// Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2019. Т. 21, № 2. С. 171–180. [Shek E.A., Sukhorukova M.V., Edelstein M.V., Skleenova E.Yu., Ivanchik N.V., Shajdullina E.R., Kuzmenkov A.Yu., Dekhnich A.V., Kozlov R.S., Semyonova N.V., Slepakova S.A., Shepotajlova N.V., Strebkova V.V., Rybina N.A., Yaranceva N.Z., Perevalova E.Yu., Rozanova S.M., Nagovicina S.G., Moldovanu M.G., Nasybullova Z.Z., Arkhipenko M.V., Shakhmuradyan R.M., Nizhegorodceva I.A., Varibrus E.V., Aleksandrova I.A., Lazareva A.V., Kryzhanovskaya O.A., Markelova N.N., Chernyavskaya Yu.L., Lebedeva E.V., Kirillova G.Sh., Bekker G.G., Popova L.D., Elokhina E.V., Smol'kova Yu.E., Zinov'ev D.Yu., Ityaeva L.N., Blinova G.Yu., Zubareva N.A., Vityazeva V.P., Plaksina M.G., Kucevalova O.Yu., Panova N.I., Suborova T.N., Polukhina O.V., Voroshilova T.M., Churikova E.M., Moskvitina E.N., Krechikova O.I., Petrova T.A., Mart'yanova N.M., Khokhlova K.O., Gudkova L.V., Bykonya S.A., Khokhlyavina R.M., Shpil'kina L.V., Burasova E.G., Khrebtovskaya V.A., Molchanova I.V., Zvonaryova O.V., Kornilova P.A., Kryanga V.G., Portnyagina U.S., Shamaeva S.Kh., Popov D.A., Vostrikova T.Yu. Antimicrobial resistance, carbapenemase production, and genotypes of nosocomial Acinetobacter spp. Isolates in Russia: results of multicenter epidemiological study "MARATHON 2015–2016". *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy, 2019, vol. 21, no. 2, pp. 171–180. (In Russ.)] doi: 10.36488/cmac.2019.2.171-180*

2. Anggraini D., Santosaningsih D., Endraswari P.D., Jasmin N., Siregar F.M., Hadi U., Kuntaman K. Multicenter study of the risk factors and outcomes of bloodstream infections caused by carbapenem-non-susceptible Acinetobacter baumannii in Indonesia. *Trop. Med. Infect. Dis., 2022, vol. 7, no. 8: 161. doi: 10.3390/tropicalmed7080161*
3. Asaad A.M., Ansari S., Ajlan S.E., Awad S.M. Epidemiology of biofilm producing Acinetobacter baumannii nosocomial isolates from a tertiary care hospital in Egypt: a cross-sectional study. *Infect. Drug Resist., 2021, vol. 14, pp. 709–717. doi: 10.2147/IDR.S261939*
4. Ayoub M.C., Hammoudi H.D. Insights into Acinetobacter baumannii: a review of microbiological, virulence, and resistance traits in a threatening nosocomial pathogen. *Antibiotics (Basel), 2020, vol. 9, no. 3: 119. doi: 10.3390/antibiotics9030119*
5. Azizi O., Shahcheraghi F., Salimizand H., Modarresi F., Shakibaie M.R., Mansouri S.H., Ramazanzadeh R., Badmasti F., Nikbin V. Molecular analysis and expression of bap gene in biofilm-forming multi-drug-resistant Acinetobacter baumannii. *Rep. Biochem. Mol. Biol., 2016, vol. 5, no. 1, pp. 62–72.*
6. Bai B., Eales B.M., Huang W., Ledesma K.R., Merlau P.R., Li G., Yu Z., Tam V.H. Clinical and genomic analysis of virulence-related genes in bloodstream infections caused by Acinetobacter baumannii. *Virulence, 2022, vol. 13, no. 1, pp. 1920–1927. doi: 10.1080/21505594.2022.2132053*
7. Bardbari A.M., Arabestani M.R., Karami M., Keramat F., Alikhani M.Y., Bagheri K.P. Correlation between ability of biofilm formation with their responsible genes and MDR patterns in clinical and environmental Acinetobacter baumannii isolates. *Microb. Pathog., 2017, vol. 108, pp. 122–128. doi: 10.1016/j.micpath.2017.04.039*
8. Bonomo R.A., Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in Acinetobacter species and Pseudomonas aeruginosa. *Clin. Infect. Dis., 2006, vol. 43, no. 2, pp. 49–56. doi: 10.1086/504477*
9. Boral B., Unaldi Ö., Ergin A., Durmaz R., Eser Ö.K., Acinetobacter Study Group. A prospective multicenter study on the evaluation of antimicrobial resistance and molecular epidemiology of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii infections in intensive care units with clinical and environmental features. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob., 2019, vol. 18, no. 1: 19. doi: 10.1186/s12941-019-0319-8*
10. Butler D.A., Biagi M., Tan X., Qasmieh S., Bulman Z.P., Wenzler E. Multidrug resistant Acinetobacter baumannii: resistance by any other name would still be hard to treat. *Curr. Infect. Dis. Rep., 2019, vol. 21, no. 12, pp. 46. doi: 10.1007/s11908-019-0706-5*
11. Chopra T., Marchaim D., Awali R.A., Krishna A., Johnson P., Tansek R., Chaudary K., Lephart P., Slim J., Hothi J., Ahmed H., Pogue J.M., Zhao J.J., Kaye K.S. Epidemiology of bloodstream infections caused by Acinetobacter baumannii and impact of drug resistance to both carbapenems and ampicillin-sulbactam on clinical outcomes. *Antimicrob. Agents Chemother., 2013, vol. 57, no. 12, pp. 6270–6275. doi: 10.1128/AAC.01520-13*
12. Diancourt L., Passet V., Nemec A., Dijkshoorn L., Brisse S. The population structure of Acinetobacter baumannii: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS One, 2010, vol. 5, no. 4: e10034. doi: 10.1371/journal.pone.0010034*
13. Djahanschiri B., Di Venanzio G., Distel J.S., Breisch J., Dieckmann M.A., Goesmann A., Averhoff B., Göttig S., Wilharm G., Feldman M.F., Ebersberger I. Evolutionarily stable gene clusters shed light on the common grounds of pathogenicity in the Acinetobacter calcoaceticus-baumannii complex. *PLoS Genet., 2022, vol. 18, no. 6: e1010020. doi: 10.1371/journal.pgen.1010020*
14. Eze E.C., Chenia H.Y., El Zowalaty M.E. Acinetobacter baumannii biofilms: effects of physicochemical factors, virulence, antibiotic resistance determinants, gene regulation, and future antimicrobial treatments. *Infect. Drug Resist., 2018, vol. 11, pp. 2277–2299. doi: 10.2147/IDR.S169894*
15. Fournier P.E., Richet H. The epidemiology and control of Acinetobacter baumannii in health care facilities. *Clin. Infect. Dis., 2006, vol. 42, no. 5, pp. 692–699. doi: 10.1086/500202*
16. Ge Y.L., Shan Q.W., Qiu Y., Zhou S.P., Cheng Y.B., Wang F., Yang J.W., Wan C.M., Zhu Y., Xu Y., Chen M.X., Lin D.J., Zhu C.H., Zeng, M. [Risk factors and resistance patterns of invasive Acinetobacter Baumannii infection in Children]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi, 2022, vol. 60, no. 8, pp. 762–768. (In Chinese). doi: 10.3760/cma.j.cn112140-20220502-00404*
17. German G.J., Gilmour M., Tipples G., Adam H.J., Almohri H., Bullard J., Dingle T., Farrell D., Girouard G., Haldane D., Hoang L., Levett P.N., Melano R., Minion J., Needle R., Patel S.N., Rennie R., Reyes R.C., Longtin J., Mulvey M.R. Canadian recommendations for laboratory interpretation of multiple or extensive drug resistance in clinical isolates of Enterobacteriaceae, Acinetobacter species and Pseudomonas aeruginosa. *Can. Commun. Dis. Rep., 2018, vol. 44, no. 1, pp. 29–34. doi: 10.14745/ccdr.v44i01a07*
18. Giannouli M., Cuccurullo S., Crivaro V., Di Popolo A., Bernardo M., Tomasone F., Amato G., Brisse S., Triassi M., Utili R., Zarrilli R. Molecular epidemiology of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii in a tertiary care hospital in Naples, Italy, shows the emergence of a novel epidemic clone. *J. Clin. Microbiol., 2010, vol. 48, no. 4, pp. 1223–1230. doi: 10.1128/JCM.02263-09*
19. Hammerum A.M., Hansen F., Skov M.N., Stegger M., Andersen P.S., Holm A., Jakobsen L., Justesen U.S. Investigation of a possible outbreak of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii in Odense, Denmark using PFGE, MLST and whole-genome-based SNPs. *J. Antimicrob. Chemother., 2015, vol. 70, no. 7, pp. 1965–1968. doi: 10.1093/jac/dkv072*
20. Hu P., Chen J., Chen Y., Zhou T., Xu X., Pei X. Molecular epidemiology, resistance, and virulence properties of Pseudomonas aeruginosa cross-colonization clonal isolates in the non-outbreak setting. *Infect. Genet. Evol., 2017, vol. 55, pp. 288–296. doi: 10.1016/j.meegid.2017.09.010*
21. Ibrahim S., Al-Saryi N., Al-Kadmy I.M.S., Aziz S.N. Multidrug-resistant Acinetobacter baumannii as an emerging concern in hospitals. *Mol. Biol. Rep., 2021, vol. 48, no. 10, pp. 6987–6998. doi: 10.1007/s11033-021-06690-6*
22. Isler B., Doi Y., Bonomo R.A., Paterson D.L. New treatment options against carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii infections. *Antimicrob. Agents Chemother., 2018, vol. 63, no. 1: e01110-18. doi: 10.1128/AAC.01110-18*
23. Jain M., Sharma A., Sen M.K., Rani V., Gaind R., Suri J.C. Phenotypic and molecular characterization of Acinetobacter baumannii isolates causing lower respiratory infections among ICU patients. *Microb. Pathog., 2019, vol. 128, pp. 75–81. doi: 10.1016/j.micpath.2018.12.023*
24. Jalal D., Elzayat M.G., Diab A.A., El-Shqanqery H.E., Samir O., Bakry U., Hassan R., Elanany M., Shalaby L., Sayed A.A. Deciphering multidrug-resistant Acinetobacter baumannii from a pediatric cancer hospital in Egypt. *mSphere, 2021, vol. 6, no. 6: e0072521. doi: 10.1128/mSphere.00725-21*
25. Jolley K.A., Bray J.E., Maiden M.C.J. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res., 2018, vol. 3: 124. doi: 10.12688/wellcomeopenres.14826.1*
26. Karah N., Sundsfjord A., Towner K., Samuelsen Ø. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of Acinetobacter baumannii. *Drug Resist. Updat., 2012, vol. 15, no. 4, pp. 237–247. doi: 10.1016/j.drup.2012.06.001*

27. Kodori M., Douraghi M., Yaseri M., Rahbar M. The impact of primer sets on detection of the gene encoding biofilm-associated protein (Bap) in Acinetobacter baumannii: in silico and in vitro analysis. *Lett. Appl. Microbiol., 2017, vol. 64, no. 4, pp. 304–308. doi: 10.1111/lam.12717*
28. Lee C.R., Lee J.H., Park M., Park K.S., Bae I.K., Kim Y.B., Cha C.J., Jeong B.C., Lee S.H. Biology of Acinetobacter baumannii: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. *Front. Cell. Infect. Microbiol., 2017, vol. 7: 55. doi: 10.3389/fcimb.2017.00055*
29. Lee Y.T., Kuo S.C., Chiang M.C., Yang S.P., Chen C.P., Chen, T. L., Fung, C. P. Emergence of carbapenem-resistant non-baumannii species of Acinetobacter harboring a blaOXA-51-like gene that is intrinsic to A. baumannii. *Antimicrob. Agents Chemother., 2012, vol. 56, no. 2, pp. 1124–1127. doi: 10.1128/AAC.00622-11*
30. Li P., Niu W., Li H., Lei H., Liu W., Zhao X., Guo L., Zou D., Yuan X., Liu H., Yuan J., Bai, C. Rapid detection of Acinetobacter baumannii and molecular epidemiology of carbapenem-resistant A. baumannii in two comprehensive hospitals of Beijing, China. *Front. Microbiol., 2015, vol. 6: 997. doi: 10.3389/fmicb.2015.00997*
31. Marra A.R., Camargo L.F., Pignatari A.C., Sukiennik T., Behar P.R., Medeiros E.A., Ribeiro J., Girão E., Correa L., Guerra C., Brites C., Pereira C.A., Carneiro I., Reis M.,Souza M.A., Tranchesi R., Barata C.U., Edmond M.B., Brazilian SCOPE Study Group. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. *J. Clin. Microbiol., 2011, vol. 49, no. 5, pp. 1866–1871. doi: 10.1128/JCM.00376-11*
32. Martinez J., Razo-Gutierrez C., Le, C., Courville R., Pimentel C., Liu C., Fung S.E., Tuttobene M.R., Phan K., Vila A.J., Shahrestani P., Jimenez V., Tolmasky M.E., Becka S.A., Papp-Wallace K.M., Bonomo R.A., Soler-Bistue A., Sieira R., Ramirez, M.S. Cerebrospinal fluid (CSF) augments metabolism and virulence expression factors in Acinetobacter baumannii. *Sci. Rep., 2021, vol. 11, no. 1, pp. 4737. doi: 10.1038/s41598-021-81714-6*
33. Mohd S.L. S., Zainal A.A., Liew S.M., Roberts J.A., Sime F.B. The global prevalence of multidrug-resistance among Acinetobacter baumannii causing hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia and its associated mortality: a systematic review and meta-analysis. *J. Infect., 2019, vol. 79, no. 6, pp. 593–600. doi: 10.1016/j.jinf.2019.09.012*
34. Nasr P. Genetics, epidemiology, and clinical manifestations of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. *J. Hosp. Infect., 2020, vol. 104, no. 1, pp. 4–11. doi: 10.1016/j.jhin.2019.09.021*
35. Nemec A., Krizova L., Maixnerova M., Reijden T.J., Deschaght P., Passet V., Vaneechoutte M., Brisse S., Dijkshoorn L. Genotypic and phenotypic characterization of the Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex with the proposal of Acinetobacter pittii sp. nov. (formerly Acinetobacter genomic species 3) and Acinetobacter nosocomialis sp. nov. (formerly Acinetobacter genomic species 13TU). *Res. Microbiol., 2011, vol. 162, no. 4, pp. 393–404. doi: 10.1016/j.resmic.2011.02.006*
36. Nowak P., Paluchowska P. Acinetobacter baumannii: biology and drug resistance — role of carbapenemases. *Folia Histochem. Cytobiol., 2016, vol. 54, no. 2, pp. 61–74. doi: 10.5603/FHC.a2016.0009*
37. Nowak P., Paluchowska P.M., Budak A. Co-occurrence of carbapenem and aminoglycoside resistance genes among multidrug-resistant clinical isolates of Acinetobacter baumannii from Cracow, Poland. *Med. Sci. Monit. Basic Res., 2014, vol. 20, pp. 9–14. doi: 10.12659/MSMBR.889811*
38. Pakharukova N., Tuittila M., Paavilainen S., Malmi H., Parilova O., Teneberg S., Knight S.D., Zavialov A.V. Structural basis for Acinetobacter baumannii biofilm formation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA, 2018, vol. 115, no. 21, pp. 5558–5563. doi: 10.1073/pnas.1800961115*
39. Paterson D.L., Bonomo R.A. Multidrug-resistant gram-negative pathogens: the urgent need for 'old' polymyxins. *Adv. Exp. Med. Biol., 2019, vol. 1145, pp. 9–13. doi: 10.1007/978-3-030-16373-0_2*
40. Peleg A.Y., Seifert H., Paterson D.L. Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev., 2008, vol. 21, no. 3, pp. 538–582. doi: 10.1128/CMR.00058-07*
41. Perez F., El Chakhtoura N.G., Yasmin M., Bonomo R.A. Polymyxins: to combine or not to combine? *Antibiotics (Basel), 2019, vol. 8, no. 2: 38. doi: 10.3390/antibiotics8020038*
42. Perez F., Hujer A.M., Hujer K.M., Decker B.K., Rather P.N., Bonomo R.A. Global challenge of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. *Antimicrob. Agents Chemother., 2007, vol. 51, no. 10, pp. 3471–3484. doi: 10.1128/AAC.01464-06*
43. Ramirez M.S., Nikolaidis N., Tolmasky M.E. Rise and dissemination of aminoglycoside resistance: the aac(6')-Ib paradigm. *Front. Microbiol., 2013, vol. 4: 121. doi: 10.3389/fmicb.2013.00121*
44. Ramirez M.S., Tolmasky M.E. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist. Updat., 2010, vol. 13, no. 6, pp. 151–171. doi: 10.1016/j.drup.2010.08.003*
45. Ranjbar R., Farahani A. Study of genetic diversity, biofilm formation, and detection of Carbapenemase, MBL, ESBL, and tetracycline resistance genes in multidrug-resistant Acinetobacter baumannii isolated from burn wound infections in Iran. *Antimicrob. Resist. Infect. Control, 2019, vol. 8: 172. doi: 10.1186/s13756-019-0612-5*
46. Robenshtok E., Paul M., Leibovici L., Fraser A., Pitlik S., Ostfeld I., Samra Z., Perez S., Lev B., Weinberger M. The significance of Acinetobacter baumannii bacteraemia compared with Klebsiella pneumoniae bacteraemia: risk factors and outcomes. *J. Hosp. Infect., 2006, vol. 64, no. 3, pp. 282–287. doi: 10.1016/j.jhin.2006.06.025*
47. Russo A., Bassetti M., Bellelli V., Bianchi L., Marincola Cattaneo F., Mazzocchetti S., Paciacconi E., Cottini F., Schiattarella A., Tufaro G., Sabetta F., D'Avino A. Efficacy of a fosfomycin-containing regimen for treatment of severe pneumonia caused by multidrug-resistant Acinetobacter baumannii: a prospective, observational study. *Infect. Dis. Ther., 2021, vol. 10, no. 1, pp. 187–200. doi: 10.1007/s40121-020-00357-8*
48. Schleicher X., Higgins P.G., Wisplinghoff H., Körber-Irrgang B., Kresken M., Seifert H. Molecular epidemiology of Acinetobacter baumannii and Acinetobacter nosocomialis in Germany over a 5-year period (2005–2009). *Clin. Microbiol. Infect., 2013, vol. 19, no. 8, pp. 737–742. doi: 10.1111/1469-0691.12026*
49. Shin B., Park W. Antibiotic resistance of pathogenic Acinetobacter species and emerging combination therapy. *J. Microbiol., 2017, vol. 55, no. 11, pp. 837–849. doi: 10.1007/s12275-017-7288-4*
50. Slauch J.M. How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question. *Mol. Microbiol., 2011, vol. 80, no. 3, pp. 580–583. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07612.x*
51. Stepanović S., Vuković D., Hola V., Di Bonaventura G., Djukić S., Cirković I., Ruzicka F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS, 2007, vol. 115, no. 8, pp. 891–899. doi: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x*

52. Thorarinsdottir H.R., Kander T., Holmberg A., Petronis S., Klarin B. Biofilm formation on three different endotracheal tubes: a prospective clinical trial. *Crit. Care, 2020, vol. 24, no. 1: 382. doi: 10.1186/s13054-020-03092-1*
53. Vijayakumar K., Thirunanasambandham R. 5-Hydroxymethylfurfural inhibits Acinetobacter baumannii biofilms: an in vitro study. *Arch. Microbiol., 2021, vol. 203, no. 2, pp. 673–682. doi: 10.1007/s00203-020-02061-0*
54. Villalón P., Valdezate S., Medina-Pascual M.J., Carrasco G., Vindel A., Saez-Nieto J.A. Epidemiology of the Acinetobacter-derived cephalosporinase, carbapenem-hydrolysing oxacillinase and metallo-β-lactamase genes, and of common insertion sequences, in epidemic clones of Acinetobacter baumannii from Spain. *J. Antimicrob. Chemother., 2013, vol. 68, no. 3, pp. 550–553. doi: 10.1093/jac/dks448*
55. Wang X., Zhang L., Sun A., Yang X., Sang W., Jiang Y., Cheng J., Wang J., Zhou M., Chen B., Ouyang J. Acinetobacter baumannii bacteraemia in patients with haematological malignancy: a multicentre retrospective study from the Infection Working Party of Jiangsu Society of Hematology. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 2017, vol. 36, no. 7, pp. 1073–1081. doi: 10.1007/s10096-016-2895-2*
56. Wong D., Nielsen T.B., Bonomo R.A., Pantapalangkoor P., Luna B., Spellberg B. Clinical and pathophysiological overview of Acinetobacter infections: a century of challenges. *Clin. Microbiol. Rev., 2017, vol. 30, no. 1, pp. 409–447. doi: 10.1128/CMR.00058-16*
57. Zeighami H., Valadkhani F., Shapouri R., Samadi E., Haghi F. Virulence characteristics of multidrug resistant biofilm forming Acinetobacter baumannii isolated from intensive care unit patients. *BMC Infecti. Dis., 2019, vol. 19, no. 1, pp. 629. doi: 10.1186/s12879-019-4272-0*
58. Zhang S., Sun L., Sun L., Yang Z. [Application progress of polymyxin in bloodstream infection of drug-resistant Acinetobacter baumannii]. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue, 2021, vol. 33, no. 11, pp. 1401–1404. (In Chinese). doi: 10.3760/cma.j.cn121430-20210219-00255*

Авторы:
Садеева З.З., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия;
Новикова И.Е., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия;
Алябьева Н.М., к.м.н., старший научный сотрудник, зав. лабораторией экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия;
Лазарева А.В., д.м.н., главный научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии, зав. лабораторией микробиологии ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия;
Комягина Т.М., младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия;
Карасева О.В., д.м.н., зав. отделом неотложной хирургии и травм детского возраста ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия; зам. директора по научной работе, руководитель отдела сочетанной травмы, анестезиологии-реанимации НИИ неотложной детской хирургии и травматологии Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия;
Вершинина М.Г., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории медицинской геномики ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия;
Фисенко А.П., д.м.н., профессор, директор ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия.

Authors:
Sadeeva Z.Z., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Microbiology, National Medical Research Center for Children's Health, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;
Novikova I.E., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Microbiology, National Medical Research Center for Children's Health, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;
Alyabyeva N.M., PhD (Medicine), Senior Researcher, Head of the Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center for Children's Health, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;
Lazareva A.V., DSc (Medicine), Head Researcher, Laboratory of Molecular Microbiology, Head of the Microbiology Laboratory, National Medical Research Center for Children's Health, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;
Komyagina T.M., Junior Researcher, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center for Children's Health, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;
Karaseva O.V., DSc (Medicine), Head of the Department of Emergency Surgery and Pediatric Trauma, National Medical Research Center for Children's Health, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation; Deputy Director for Scientific Work, Head of the Department of Combined Trauma, Anesthesiology-Resuscitation, Clinical and Research Institute of Emergency Pediatric Surgery and Trauma, Department of Public Health of Moscow, Moscow, Russian Federation;
Vershinina M.G., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Medical Genomics, National Medical Research Center for Children's Health, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;
Fisenko A.P., DSc (Medicine), Professor, Director of the National Medical Research Center for Children's Health, Ministry of Health of the Russian Federation.

Поступила в редакцию 05.12.2022
Отправлена на доработку 07.03.2023
Принята к печати 11.03.2023

Received 05.12.2022
Revision received 07.03.2023
Accepted 11.03.2023

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 2, с. 302–308

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 2, pp. 302–308

RISK ASSESSMENT OF FIRST-LINE TREATMENT FAILURE IN UNTREATED HIV PATIENTS IN NORTHWESTERN FEDERAL DISTRICT OF THE RUSSIAN FEDERATION

A.N. Schemelev[a], Yu.V. Ostankova[a], D.E. Valutite[a], E.N. Serikova[a], E.B. Zueva[a], A.V. Semenov[b], A.A. Totolian[a]

[a] *St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation*
[b] *Federal Research Institute of Viral Infections "Virome" of Rospotrebnadzor, Ekaterinburg, Russian Federation*

Abstract. The HIV infection epidemic in Russia continues to evolve, and HIV infection cases have been registered in all territorial entities of the Russian Federation. 2021 Treatment coverage was 82.2% and 56.4% individuals under dispensary observation and living with diagnosed HIV infection. 79.9% receiving ART subjects were shown to achieve undetectable viral load. Highly active antiretroviral therapy (HAART) currently represents a combination of three (less frequently four) antiretroviral drugs targeting pathways involved in various stages of HIV replication *in vivo*. Treatment failure is a problem facing doctors and patients using HAART. The most common cause of therapeutic failure is the development of HIV drug resistance. The emergence of resistance is associated with processes involving mutation occurring in the viral genome influenced by evolutionary factors. Therefore, it is important clinically and programmatically to learn more about the rate of first-line treatment failure, the rate of switching to a second-line ART regimen, and to identify patients at risk to develop strategies for preventing development of further failure cases. The study was aimed at analyzing ineffectiveness of first-line ART therapy in patients in Northwestern Federal District of the Russian Federation. *Materials and methods.* Sequencing reactions were performed using the AmpliSens HIV Resist-Seq. Assembly of consensus sequences from fragments obtained during sequencing was carried out using Unipro UGENE software. Isolate genotyping was performed using the MEGA-X software with the Neighbor-joining algorithm. *Results.* The HIV *pol* genes in 239 patients with first-line ART failure and 100 naïve patients were sequenced; all sequences genotyped as HIV-1 subsubtype A6. According to analysis, 82% of patients had at least one significant mutation associated with drug resistance for the corresponding viral subtype. In total, we encountered 87 different drug resistance mutations. *Conclusion.* We have shown increased proportion of patients with first-line ART failure among all patients with treatment failure. The main cause for such changes is probably related to the prevalence of primary drug resistance, estimated here at 8%. Specific differences were found between drug resistance mutation profiles in patients without suppressed viral load and patients with virological breakthrough. The overall results of the study indicate a need to diagnose and characterize HIV drug resistance prior to initiation of therapy in order to avoid ineffective first-line antiretroviral treatment.

Key words: *HIV, recombinant forms of HIV, HIV drug resistance, laboratory diagnostics.*

Адрес для переписки:
Щемелев Александр Николаевич
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 (812) 233-20-92; 8 999 033-59-66 (моб.).
E-mail: tvildorm@gmail.com

Contacts:
Alexandr N. Schemelev
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 233-20-92; +7 999 033-59-66 (mobile).
E-mail: tvildorm@gmail.com

Для цитирования:
Щемелев А.Н., Останкова Ю.В., Валутите Д.Э., Серикова Е.Н., Зуева Е.Б., Семенов А.В., Тотолян А.А. Риск неэффективности терапии первой линии у пациентов с ВИЧ в Северо-Западном федеральном округе России // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 2. С. 302–308. doi: 10.15789/2220-7619-RAO-2122

Citation:
Schemelev A.N., Ostankova Yu.V., Valutite D.E., Serikova E.N., Zueva E.B., Semenov A.V., Totolian A.A. Risk assessment of first-line treatment failure in untreated HIV patients in Northwestern federal district of the Russian Federation // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 2, pp. 302–308. doi: 10.15789/2220-7619-RAO-2122

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-RAO-2122

РИСК НЕЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ ПЕРВОЙ ЛИНИИ У ПАЦИЕНТОВ С ВИЧ В СЕВЕРО-ЗАПАДНОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ РОССИИ

Щемелев А.Н.[1], Останкова Ю.В.[1], Валутите Д.Э.[1], Серикова Е.Н.[1], Зуева Е.Б.[1], Семенов А.В.[2], Тотолян А.А.[1]

[1] *ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия*

[2] *ФБУН Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Екатеринбург, Россия*

Резюме. *Введение.* Эпидемия ВИЧ-инфекции в России продолжает развиваться, случаи ВИЧ-инфекции зарегистрированы во всех субъектах Российской Федерации. Охват лечением в 2021 г. составил 82,2% от числа находящихся на диспансерном наблюдении и 56,4% от всех лиц с ВИЧ-инфекцией. У 79,9% получавших АРТ, была достигнута неопределяемая вирусная нагрузка. Высокоактивная антиретровирусная терапия (ВААРТ) в настоящее время представляет собой комбинацию трех (реже четырех) антиретровирусных препаратов; эти пути-мишени участвуют в различных стадиях репликации ВИЧ в организме. Неэффективность лечения — проблема, с которой сталкиваются врачи и пациенты, применяющие ВААРТ. Наиболее распространенной причиной терапевтической неудачи является развитие лекарственной устойчивости ВИЧ. Возникновение резистентности связано с процессами, сопровождающимися мутациями, происходящими в вирусном геноме под влиянием эволюционных факторов. Таким образом, важно больше узнать о частоте неудач лечения первого ряда, частоте перехода на схему АРТ второго ряда, а также определить, какие пациенты подвержены риску, чтобы разработать стратегии предотвращения случаев неэффективности. Цель работы — проанализировать неэффективность терапии первой линии у больных в Северо-Западном федеральном округе России. *Материалы и методы.* Реакции секвенирования проводили с использованием AmpliSens HIV Resist-Seq. Сборку консенсусных последовательностей из фрагментов, полученных при секвенировании, проводили с помощью программного обеспечения Unipro UGENE. Генотипирование изолятов проводили с помощью программы MEGA-X с использованием алгоритма Neighbor-joining. *Результаты.* Были получены последовательности гена *pol* 239 пациентов с неэффективностью АРТ первой линии и 100 пациентов, ранее не получавших АРТ; все последовательности генотипированы как суб-субтип A6. Согласно анализу, у 82% пациентов была хотя бы одна значимая мутация, связанная с лекарственной устойчивостью для соответствующего подтипа вируса. Всего мы столкнулись с 87 различными мутациями лекарственной устойчивости. *Выводы.* Мы показали увеличение доли пациентов с неэффективностью АРТ первой линии среди всех пациентов с неэффективностью лечения. Основной причиной этих изменений, вероятно, является распространенность первичной лекарственной устойчивости, оцененная в этой статье в 8%. Определенные различия были обнаружены между профилями мутаций лекарственной устойчивости у пациентов без подавления вирусной нагрузки и у пациентов с вирусологическим прорывом. Общие результаты работы свидетельствуют о необходимости диагностики и характеристики лекарственной устойчивости ВИЧ до начала терапии во избежание неэффективности антиретровирусной терапии первой линии.

Ключевые слова: *ВИЧ, рекомбинантные формы ВИЧ, лекарственная устойчивость ВИЧ, лабораторная диагностика.*

Introduction

Human immunodeficiency virus (HIV) is the cause of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), which is responsible for the deaths of over 38 million people [18, 33]. Because there is no cure for HIV, patients are subject to lifelong therapy, yet when the first HIV drugs were introduced, resistance evolved in nearly all treated individuals in the first 6 months of treatment, sometimes within weeks [13, 27]. This drug resistance (DR), often encoded by single mutations conferring strong resistance, led to rebounding viral populations and treatment failure [9, 14].

Highly active antiretroviral therapy (HAART), introduced in 1995, was expected to prevent the evolution of drug resistance and subsequent treatment failure [10]. However, while triple-drug combination therapies have saved many lives, HIV has continued to evolve drug resistance all the way up to the present [11, 15, 24, 35]. The high mutation rate of HIV is critical for its survival during drug therapies. The virus can obtain drug resistance mutations, and they are one of the major challenges for effective HAART. Some drug-resistant viruses are also capable of being transmitted, and consequently these strains can increase in prevalence as described below [2, 4, 17, 36]. Adhering to the ART regimen is crucial to achieve and maintain viral suppression as well as to prevent further HIV transmission and the progression of HIV infection [1, 3]. Furthermore, close adherence to ART (over 95% of the time) is required to achieve full viral load suppression. When patients fail to attain the required adherence level, they may experience a poorer prognosis, higher morbidity/mortality, or the development of resistance to ART [12, 21].

The HIV infection epidemic in Russia continues to evolve [32], and HIV infection cases have been registered in all territorial entities of the Russian Federation. The number of Russian regions with

a high prevalence of HIV infection (more than 0.5% of the population) reached 34 in 2018. In the first half of 2020, 38 126 individuals with antibodies to HIV-1 were newly identified in Russia. By the end of the first half of 2020, 1 094 050 Russians with laboratory-diagnosed HIV infection were known to be living in the country [6]. The number of patients receiving antiretroviral therapy was 660 821 in 2021. Treatment coverage in 2021 was 82.2% of the number of those under dispensary observation and 56.4% of the number of those living with a diagnosis of HIV infection. In 527 705 patients, 79.9% of those receiving ART, an undetectable viral load was achieved [7].

Therefore, surveillance of the HIV epidemic and HIV DR is strongly needed in the region since increased ART coverage and a subsequent increase in HIV DR to those drugs used can significantly worsen therapeutic effectiveness or make it impossible to achieve the goals of the 90–90–90 initiative [34]. With this intended rapid scaling up of detection and therapy, it is also important to sustain treatment success with undetectable viral loads in patients on first-line ART. Otherwise, failure on first-line regimens can lead to a complicated, less tolerable, and more expensive second-line ART regimen with fewer drug options if drug related toxicities develop.

Therefore, it is important clinically and programmatically to learn more about the rate of first-line treatment failure, the rate of switching to a second-line ART regimen, and to identify which patients are at risk in order to develop strategies to prevent development of further failure cases.

The aim of the work was to analyze ineffectiveness of first-line therapy in patients in Russia's Northwestern Federal District.

Materials and methods

The study was approved by the Ethics Committee of the Saint Petersburg Pasteur Institute. It included analysis of HIV samples obtained from: 239 patients with first-line ART failure who contacted the Northwestern Federal District AIDS Center for diagnostic clarification of drug resistance status in the period 2014–2018; and from 100 patients without any history of ART.

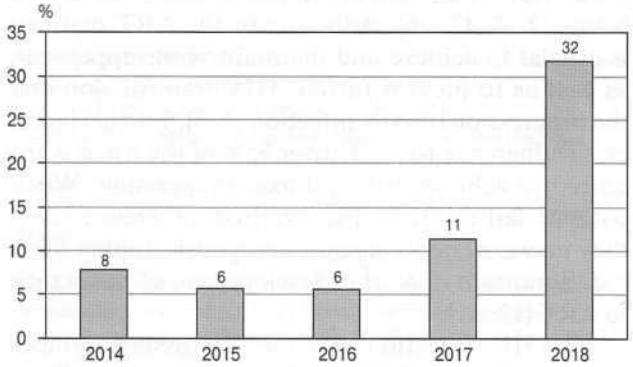


Figure 1. 2014–2018 proportion of patients with first-line ART failure

Quantitative analysis of HIV RNA was carried out with the AmpliSens® HIV-Monitor-FRT commercial kit (Central Research Institute of Epidemiology, Russia), with a sensitivity threshold of 500 copies/ml. Samples with a detectable viral load (VL) were analyzed using RT-PCR and Sanger sequencing. For reverse transcription and amplification of HIV RNA, the RT-PCR-kit-Pro/Rev and PCR-kit-Pro/Rev commercial kits (Central Research Institute of Epidemiology, Russia) were used. Sequencing reactions were performed using the AmpliSens® HIVResist-Seq kit (Central Research Institute of Epidemiology, Russia) according to manufacturer instructions, as described earlier [26]. Sequencing was carried out using Applied Biosystems 3500 genetic analyzers according to instructions.

Assembly of consensus sequences from fragments obtained during sequencing was carried out using Unipro UGENE software [8, 22, 25]. The consensus sequence included a 1302 nt region of the polymerase *(pol)* gene encoding protease (PR) and a part of reverse transcriptase (RT/OT) in the 2253–3554 nt region; coordinates are given for HIV HXB2 in the GenBank database (K03455.1). The resulting sequences were analyzed for the presence of drug resistance mutations using the Stanford database [31]. Sample genotyping was performed using the REGA HIV-1 Subtyping Tool 3.0 [23].

The statistical significance of differences was determined using the chi-square test (χ^2). The level of significance (p) adopted in this work was 0.05 (or 5.0%). Confidence intervals were determined by the method of Klopper–Pearson.

Results

Study patients contacted the Northwestern Federal District AIDS Center for diagnostic clarification of drug resistance status over the 2014–2018 period. The proportion of patients with first-line ART failure (among all patients with ART failure) was not the same across years (Fig. 1).

The HIV pol genes of 239 patients with first-line ART failure were sequenced; all sequences genotyped as HIV-1 subsubtype A6. According to analysis, 82% (82% NRTI, 72% NNRTI) of patients had at least one significant mutation associated with drug resistance for the corresponding viral subtype. In total, we encountered 87 different drug resistance mutations (49 NRTI, 38 NNRTI). The most common mutations in patients are presented in Table 1.

The HIV *pol* genes of 100 patients with no history of ART were sequenced; all sequences genotyped as HIV-1 subsubtype A6. Viral genomes from 8 subjects (8%, 95% CI 3.52–15.16%) were found to harbor resistance-conferring mutations to NRTIs. Four

of these were found to harbor mutations associated with zidovudine resistance. All significant drug resistance mutations encountered were found in single cases: K70E; K70R; D67N; L74; and M184V (in combination with NNRTI-related resistance mutations V106M and G190S). An isolated amino acid substitution, D67N, was found in one sample; it is associated with resistance to zidovudine only in combination with other resistance-conferring mutations (i.e., M41L, K70R, and T215Y). A62V (n = 4) was identified by itself (3 samples) and once in combination with an NNRTI resistance mutation, V179D (1 sample).

Discussion

We draw attention here to the fact of an increase in the number of patients experiencing ineffectiveness with 1st line ART. Federal AIDS Center reports also point to the insufficient effectiveness of ART. In only 80% of those receiving ART was an undetectable viral load achieved [7]. This trend is likely associated with an increase in the prevalence of primary HIV drug resistance in Russia, which is 5–7% according to various estimates [16].

A similar prevalence of primary drug resistance was obtained in this study. Moreover, the most common DR mutations in naive patients are multiple drug resistance to drugs of the NRTI and NNRTI classes, which are most often the main first-line ART. The pattern of DR mutations among patients with first-line ART failure is consistent with the most common resistance mutations described in the literature [19, 29].

However, there is significant heterogeneity in the occurrence of some mutations within the study group. Conventionally, the group can be divided into two subgroups: the first — patients who did not achieve viral load suppression (n = 124); and the second — patients in whom the viral load was suppressed, after which there was a virological breakthrough, i.e., a growth in viral load (n = 115). Comparison of these subgroups revealed a difference in the occurrence of some significant drug resistance mutations (Fig. 2). For individual mutations, differences in occurrence reached statistical significance ($p < 0.05$) (Table 2).

The most characteristic mutations for patients in the first group (inadequate suppression) were K65R, Y181C, and Y115F. In the second group (inadequate suppression with breakthrough), they were M184V, D67N, K103N, and T215Y. Accordingly, for patients who experienced a virological breakthrough after long-term use of one ART regimen, thymidine analogue resistance mutations (TAM) were more common, as well as the K103N NNRTI resistance mutation. For patients who initially failed therapy, mutations to non-thymidine nucleoside analogues and NNRTI resistance mutation Y181C were seen.

Table 1. Prevalence and description of drug resistance mutations in the studied HIV-1 samples using the Stanford HIVdb Program (https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-mutations)

Mutation	Percentage (95% confidence interval)	Description
M184V	53% (46.59–59.34%)	M184V/I causes high-level resistance to 3TC and FTC, and low-level resistance to ddI and ABC.
G190S	37% (30.98–43.33%)	G190S is a nonpolymorphic mutation causing high-level resistance to NVP and EFV (> 50-fold reduced susceptibility).
K101E	24% (18.82–29.81%)	K101E is a nonpolymorphic mutation causing intermediate resistance to NVP (~5-fold reduced susceptibility) and low-level resistance (~2-fold reduced susceptibility) to EFV, ETR and RPV.
K65R	23% (17.91–28.74%)	K65R causes intermediate/high-level resistance to TDF, ddI, ABC and d4T (2 to 3-fold reduced susceptibility) and low to intermediate-level resistance to 3TC and FTC (5 to 7-fold reduced susceptibility). K65R increases susceptibility to AZT.
A62V	15% (10.79–20.07%)	A62V is an accessory mutation that often occurs in combination with the multinucleoside resistance mutations K65R or Q151M. Alone it does not reduce NRTI susceptibility. A62V is widespread in subtype A viruses in former Soviet Union countries but is otherwise nonpolymorphic.
Y181C	14% (9.92–18.96%)	Y181C is a nonpolymorphic mutation selected in patients receiving NVP, ETR and RPV. Although Y181C itself reduces EFV susceptibility by as few as 2-fold, it is associated with a reduced response to EFV-containing regimen because viruses with this mutation often harbor additional minority variant NNRTI resistance mutations.
K103N	11% (7.38–15.59%)	K103N is a nonpolymorphic mutation causing high-level resistance to NVP and EFV
E138A	11% (7.38–15.59%)	E138A is a common polymorphic accessory mutation weakly selected in patients receiving ETR and RPV.
L74V	9% (5.73–13.29%)	L74V/I cause high-level resistance to ddI and intermediate-level resistance to ABC. L74V increases susceptibility to AZT and TDF, but this increase is of uncertain clinical significance.

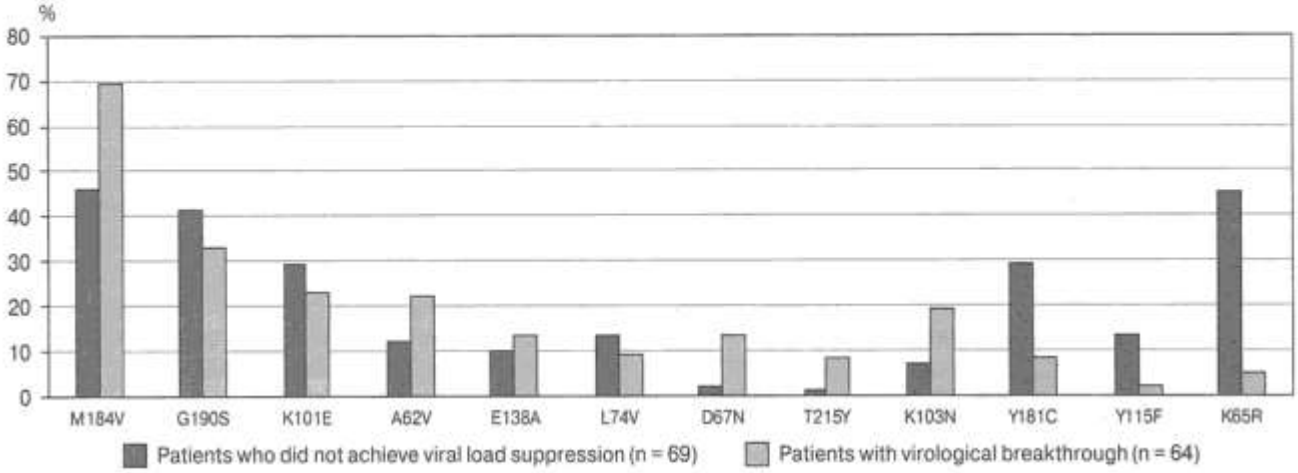


Figure 2. Heterogeneity in distribution of drug resistance mutations in patients with first-line ART failure

It is interesting that M184V (the most common mutation both in the study group and in patients with HIV DR generally) was significantly more common among patients who have experienced a virological breakthrough. Apparently, mutations causing DR were obtained mainly before initiation of treatment in the first group. In such cases (before treatment), probably only those mutations that are least associated with impaired replication remain in the viral genome. In the absence of selective drug pressure, mutations which negatively affect replication have no competitive advantage and likely self-eliminate in the viral population. With ART, however, their ability to confer resistance and permit replication at all likely outweighs their detriment to replication.

However, this assumption casts doubt on the fact that TAM and the M184V mutation were also detected among naive patients in this study. In this light, additional studies are required to establish the causes of differences in the mutation profiles in the studied subgroups. It is worth noting differences in the occurrence of the A62V mutation in the different study groups. Among naive patients, the occurrence of this mutation was 4%, yet among patients with ART failure, it reached 15%. At the same time, in ART failure subgroups 1 and 2, the prevalence of this mutation was also different: 12% and 22%, respectively. This difference does not reach statistical significance (χ^2 (Yates) = 3.319, p = 0.069), but it closely approaches it.

HIV-1 reverse transcriptase (RT), the enzyme responsible for converting the single-stranded viral RNA genome into its double-stranded DNA counterpart, can acquire an A62V amino acid substitution. This is known to be associated with multidrug resistance, but is not a resistance-conferring mutation by itself [28, 30]. It is known that the A62V mutation alone can significantly increase viral mutation frequency [5, 20], while negatively impacting replicative capacity and viral fitness in the absence or presence of AZT. The fact that differences in A62V occurrence did not reach significance may be due to insufficient sample sizes. Nevertheless, the current trend may suggest that presence of this mutation is associated with an increased risk of virological breakthrough in patients and subsequent higher mortality rates.

Table 2. Mutations with significant differed prevalence between patients achieving no viral load suppression and virological breakthrough

Mutation	Patients achieving no viral load suppression	Patients with virological breakthrough	χ^2 (Yates)	p-value
K65R	45%	5%	47.494	< 0.001
M184V	46%	69%	11.658	< 0.001
Y181C	29%	8%	16.196	< 0.001
Y115F	13%	2%	9.135	< 0.001
D67N	2%	13%	8.306	0.004
K103N	7%	19%	6.636	0.012
T215Y	1%	8%	5.687	0.018

Conclusion

We have shown an increase in the proportion of patients with first-line ART failure among all patients with treatment failure. The main reason for these changes is probably the prevalence of primary drug resistance, estimated in this paper at 8%. Specific differences were found between drug resistance mutation profiles in patients without viral load suppression and patients with virological breakthrough. A possible connection between the A62V mutation and the likelihood of a virological breakthrough was found. The overall results of the work indicate the need to diagnose and characterize HIV drug resistance before initiation of therapy in order to avoid ineffective first-line antiretroviral treatment.

References

1. Bartlett J.A. Addressing the challenges of adherence. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr., 2002, vol. 29, suppl. 1, pp. S2–S10. doi: 10.1097/00126334-200202011-00002*
2. Brenner B., Wainberg M.A., Salomon H., Rouleau D., Dascal A., Spira B., Sekaly R.P., Conway B., Routy J.P. Resistance to antiretroviral drugs in patients with primary HIV-1 infection. Investigators of the Quebec Primary Infection Study. *Int. J. Antimicrob. Agents, 2000, vol. 16, no. 4, pp. 429–434. doi: 10.1016/s0924-8579(00)00270-3*
3. Bunnell R., Ekwaru J.P., Solberg P., Wamai N., Bikaako-Kajura W., Were W., Coutinho A., Liechty C., Madraa E., Rutherford G., Mermin J. Changes in sexual behavior and risk of HIV transmission after antiretroviral therapy and prevention interventions in rural Uganda. *AIDS, 2006, vol. 20, no. 1, pp. 85–92. doi: 10.1097/01.aids.0000196566.40702.28*
4. D'Aquila R.T., Schapiro J.M., Brun-Vezinet F., Clotet B., Conway B., Demeter L.M., Grant R.M., Johnson V.A., Kuritzkes D.R., Loveday C. Drug resistance mutations in HIV-1. *Top. HIV Med., 2003, no. 11, pp. 92–96.*
5. Dapp M.J., Heineman R.H., Mansky L.M. Interrelationship between HIV-1 fitness and mutation rate. *J. Mol. Biol., 2013, vol. 425, no. 1, pp. 41–53. doi: 10.1016/j.jmb.2012.10.009*
6. Fact sheets. HIV infection in the Russian Federation as of December 31, 2020. *URL: http://www.hivrussia.info/wp-content/uploads/2021/03/VICH-infektsiya-v-Rossijskoj-Federatsii-na-31.12.2020-.pdf (In Russ.)*
7. Fact sheets. HIV infection in the Russian Federation as of December 31, 2021. *URL: http://www.hivrussia.info/wp-content/uploads/2022/03/Spravka-VICH-v-Rossii-na-31.12.2021-g.pdf (In Russ.)*
8. Golosova O., Henderson R., Vaskin Y., Gabrielian A., Grekhov G., Nagarajan V., Oler A.J., Quiñones M., Hurt D., Fursov M., Huyen Y. Unipro UGENE NGS pipelines and components for variant calling, RNA-seq and ChIP-seq data analyses. *Peer J., 2014, no. 2: e644. doi: 10.7717/peerj.644*
9. Günthard H.F., Calvez V., Paredes R., Pillay D., Shafer R.W., Wensing A.M., Jacobsen D.M., Richman D.D. Human Immunodeficiency Virus Drug Resistance: 2018 Recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. *Clin. Infect. Dis., 2019, vol. 68, no. 2, pp. 177–187. doi: 10.1093/cid/ciy463*
10. Hammer S.M., Squires K.E., Hughes M.D., Grimes J.M., Demeter L.M., Currier J.S., Eron J.J., Feinberg J.E., Balfour H.H., Deyton L.R., Chodakewitz J.A., Fischl M.A., for the AIDS clinical trials group 320 study team A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. *N. Engl. J. Med., 1997, vol. 337, no. 11, pp. 725–733. doi: 10.1056/NEJM199709113371101*
11. Hogg R.S., Yip B., Kully C., Craib K.J., O'Shaughnessy M.V., Schechter M.T., Montaner J.S. Improved survival among HIV-infected patients after initiation of triple-drug antiretroviral regimens. *CMAJ, 1999, vol. 160, no. 5, pp. 659–665*
12. Iacob S.A., Iacob D.G., Jugulete G. Improving the adherence to antiretroviral therapy, a difficult but essential task for a successful HIV treatment-clinical points of view and practical considerations. *Front. Pharmacol., 2017, no. 8: 831. doi: 10.3389/fphar.2017.00831*
13. Larder B.A., Darby G., Richman D.D. HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. *Science. 1989, vol. 243, no. 4899, pp. 1731–1734. doi: 10.1126/science.2467383*
14. Larder B.A., Kemp S.D. Multiple mutations in HIV-1 reverse transcriptase confer high-level resistance to zidovudine (AZT). *Science. 1989, vol. 246, no. 4934, pp. 1155–1158. doi: 10.1126/science.2479983*
15. Lee F.J., Amin J., Carr A. Efficacy of initial antiretroviral therapy for HIV-1 infection in adults: a systematic review and meta-analysis of 114 studies with up to 144 weeks' follow-up. *PLoS One, 2014, no. 9: e97482. doi: 10.1371/journal.pone.0097482*
16. Level and structure of HIV drug resistance among naive patients in the Russian Federation. *URL: http://www.hivrussia.info/wp-content/uploads/2020/12/2020-Rossijskaya-baza-dannyh-LU-VICH-u-naivnyh-patsientov.pdf (In Russ.)*
17. Louie M., Hogan C., Di Mascio M., Hurley A., Simon V., Rooney J., Ruiz N., Brun S., Sun E., Perelson A.S., Determining the relative efficacy of highly active antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis. 2003, vol. 187, no. 6, pp. 896–900. doi: 10.1086/368164*
18. Lucas S., Nelson A.M. HIV and the spectrum of human disease. *J. Pathol., 2015, vol. 235, no. 2, pp. 229–241. doi: 10.1002/path.4449*
19. Maksimenko L.V., Totmenin A.V., Gashnikova M.P., Astakhova E.M., Skudarnov S.E., Ostapova T.S., Yaschenko S.V., Meshkov I.O., Bocharov E.F., Maksyutov R.A., Gashnikova N.M. Genetic Diversity of HIV-1 in Krasnoyarsk Krai: Area with High Levels of HIV-1 Recombination in Russia. *Biomed. Res. Int., 2020, vol. 2020: 9057541. doi: 10.1155/2020/9057541*
20. Maldonado J.O., Mansky L.M. The HIV-1 Reverse Transcriptase A62V Mutation Influences Replication Fidelity and Viral Fitness in the Context of Multi-Drug-Resistant Mutations. *Viruses., 2018, vol. 10, no. 7: 376. doi: 10.3390/v10070376*
21. Nachega J.B., Marconi V.C., van Zyl G.U., Gardner E.M., Preiser W., Hong S.Y., Mills E.J., Gross R. HIV treatment adherence, drug resistance, virologic failure: evolving concepts. *Infect. Disord. Drug Targets, 2011, vol. 11, no. 2, pp. 167–174. doi: 10.2174/187152611795589663*
22. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., the UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics, 2012, vol. 28, no. 8, pp. 1166–1167. doi:10.1093/bioinformatics/bts091*
23. Pineda-Peña A.C., Faria N.R., Imbrechts S., Libin P., Abecasis A.B., Deforche K., Gómez-López A., Camacho R.J., de Oliveira T., Vandamme A.M. Automated subtyping of HIV-1 genetic sequences for clinical and surveillance purposes: performance evaluation of the new REGA version 3 and seven other tools. *Infect. Genet. Evol., 2013, vol. 19, pp. 337–348. doi: 10.1016/j.meegid.2013.04.032*
24. Rocheleau G., Brumme C.J., Shoveller J., Lima V.D., Harrigan P.R. Longitudinal trends of HIV drug resistance in a large canadian cohort, 1996–2016. *Clin. Microbiol. Infect., 2018, vol. 24, no. 2, pp. 185–191. doi: 10.1016/j.cmi.2017.06.014*
25. Rose R., Golosova O., Sukhomlinov D., Tiunov A., Prosperi M. Flexible design of multiple metagenomics classification pipelines with UGENE. *Bioinformatics., 2019, vol. 35, no. 11, pp. 1963–1965. doi: 10.1093/bioinformatics/bty901*
26. Schemelev A.N., Ostankova Yu.V., Zueva E.B., Khanh T.H., Semenov A.V. Genotypic and pharmacoresistant HIV characteristics in patients in the Socialist Republic of Vietnam. *HIV Infection and Immunosuppressive Disorders 2020, vol. 12, no. 2, pp. 56–68. doi: 10.22328/2077-9828-2020-12-2-56-68*

27. Schuurman R., Nijhuis M., van Leeuwen R., Schipper P., de Jong D., Collis P., Danner S.A., Mulder J., Loveday C., Christopherson C. Rapid changes in human immunodeficiency virus type 1 RNA load and appearance of drug-resistant virus populations in persons treated with lamivudine (3TC). *J. Infect. Dis., 1995, vol. 171, no. 6, pp. 1411–1419. doi: 10.1093/infdis/171.6.1411*
28. Shafer R.W., Kozal M.J., Winters M.A., Iversen A.K.N., Katzenstein D.A., Ragni M.V., Meyer W.A., Gupta P., Rasheed S., Coombs R., Katzman M., Fiscus S., Merigan T.C. Combination therapy with zidovudine and didanosine selects for drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 strains with unique patterns of pol gene mutations. *J. Infect. Dis., 1994, vol. 169, no. 4, pp. 722–729. doi: 10.1093/infdis/169.4.722*
29. Shchemelev A.N., Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Zueva E.B., Valutite D.E., Semenova D.A., Davydenko V.S., Totolian A.A. Genetic diversity and drug resistance mutations of HIV-1 in Leningrad Region. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 2022, vol. 99, no. 1, pp. 28–37. doi: 10.36233/0372-9311-216 (In Russ.)*
30. Shirasaka T., Kavlick M.F., Ueno T., Gao W.Y., Kojima E., Alcaide M.L., Chokekijchai S., Roy B.M., Arnold E., Yarchoan R. Emergence of human immunodeficiency virus type 1 variants with resistance to multiple dideoxynucleosides in patients receiving therapy with dideoxynucleosides. *Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1995, vol. 92, pp. 2398–2402. doi: 10.1073/pnas.92.6.2398*
31. Soo-Yon Rhee, Matthew J. Gonzales, Rami Kantor, Bradley J. Betts, Jaideep Ravela, and Robert W. Shafer Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database. *Nucl. Acids Res., 2003, vol. 31, no. 1, pp. 298–303 doi: 10.1093/nar/gkg100*
32. UNAIDS DATA 2017. Geneva, Switzerland: Joint United Nations Programme on HIV/AIDS; 2017. *URL: https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/20170720_Data_book_2017_en.pdf*
33. UNAIDS data 2020. *URL: https://www.unaids.org/en/resources/documents/2020/unaids-data*
34. UNAIDS data, 2017. *URL: https://www.unaids.org/en/resources/documents/2017/2017_data_book*
35. Walensky R.P., Paltiel A.D., Losina E., Mercincavage L.M., Schackman B.R., Sax P.E., Weinstein M.C., Freedberg K.A. The survival benefits of AIDS treatment in the united states. *J. Infec.t Dis., 2006, vol. 194, no. 1, pp. 11–19. doi: 10.1086/505147*
36. Walsh J.C., Pozniak A.L., Nelson M.R., Mandalia S., Gazzard B.G. Virologic rebound on HAART in the context of low treatment adherence is associated with a low prevalence of antiretroviral drug resistance. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr., 2002, vol. 30, no. 3, pp. 278–287. doi: 10.1097/00126334-200207010-00003*

Авторы:
Щемелев А.Н., младший научный сотрудник лаборатории вирусологии и иммунологии ВИЧ-инфекции ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Останкова Ю.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Валутите Д.Э., врач клинико-лабораторной диагностики отделения диагностики ВИЧ-инфекции и СПИД-ассоциированных заболеваний ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Серикова Е.Н., научный сотрудник лаборатории вирусологии и иммунологии ВИЧ-инфекции ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Зуева Е.Б., к.б.н., биолог отделения диагностики ВИЧ-инфекции и СПИД-ассоциированных заболеваний ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Семенов А.В., д.б.н., директор ФБУН Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Екатеринбург, Россия;
Тотолян А.А., академик РАН, д.м.н., профессор, директор ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:
Schemelev A.N., Junior Researcher, Laboratory of Virology and Immunology of HIV Infection, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Ostankova Yu.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Valutite D.E., Clinical Laboratory Diagnostics Doctor, Department of Diagnostics of HIV Infection and AIDS-associated Diseases, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Serikova E.N., Researcher, Laboratory of Virology and Immunology of HIV Infection, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Zueva E.B., PhD (Biology), Biologist, Department of Diagnostics of HIV Infection and AIDS-associated Diseases, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Semenov A.V., DSc (Biology), Director of Federal Research Institute of Viral Infections "Virome" of Rospotrebnadzor, Ekaterinburg, Russian Federation;
Totolian A.A., RAS Full Member, DSc (Medicine), Professor, Director of St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 16.01.2023
Принята к печати 25.02.2023

Received 16.01.2023
Accepted 25.02.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 2, pp. 309–318

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 2, с. 309–318

НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЙ ИНТРАТЕКАЛЬНЫЙ СИНТЕЗ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С СИФИЛИТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

М.В. Пономарева, Н.К. Левчик, Н.В. Зильберберг

ГБУ Свердловской области Уральский научно-исследовательский институт дерматовенерологии и иммунопатологии, г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Интратекальный синтез иммуноглобулинов имеет место при различных видах инфекционной и неинфекционной воспалительной патологии ЦНС, в том числе при поражении ЦНС при сифилитической инфекции (нейросифилисе). Одной из проблем диагностики и контроля лечения нейросифилиса является факт длительно (до нескольких лет) сохраняющегося интратекального синтеза антител («серологического шрама») после терапии у части пациентов. Целью настоящего исследования являлось тестирование гипотезы о том, что длительно текущее хроническое воспаление в ЦНС, вызванное сифилитической инфекцией, может быть триггером неспецифического гуморального иммунного ответа, а феномен «серологического шрама» после перенесенного нейросифилиса может быть результатом неспецифической активации В-клеток ЦНС в отсутствие антигена. Инструментом для детекции неспецифической стимуляции антител-продуцирующих клеток в ЦНС является так называемая MRZ-реакция, одновременный интратекальный синтез антител, определяемый как повышенный антительный индекс против нейротропных вирусов, таких как вирус кори (measles, M), краснухи (rubella, R) или варицелла-зостер вирус (varicella zoster virus, Z). Положительная MRZ-реакция в неврологии поддерживает диагностику хронического или аутоиммунного заболевания с участием ЦНС и является хорошо известным феноменом при рассеянном склерозе, однако малоизучена при нейроинфекциях, в том числе нейросифилисе. В исследование были включены 147 пациентов с поздними стадиями сифилиса, серопозитивных к нейротропным вирусам MRZ. Основываясь на клинико-анамнестических и лабораторных данных, диагноз «нейросифилис» был установлен 43 пациентам, исключен — 88 пациентам, 16 пациентов поступили для проведения контрольной люмбальной пункции после проведенного лечения нейросифилиса (7 месяцев — 5 лет). В парных образцах цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) и крови, помимо диагностических тестов, проведено количественное определение общих иммуноглобулинов, альбумина, вирус- и *Treponema pallidum*-специфических антител. Оценка интратекального синтеза антител проводилась по методологии, предложенной H. Reiber. В целом, в обследованной когорте (n = 147) 27 пациентов (18%, 95% доверительный интервал (ДИ) 12–25%) имели положительную MRZ-реакцию, то есть антительный индекс ≥ 1,5 для одного, двух или трех вирусов, би- и триспецифическая MRZ-реакция присутствовала у 7 из 147 пациентов (5%, 95% ДИ: 2–10%). Не было статистически значимых различий между перечисленными категориями пациентов, наличие положительной MRZ-реакции не было связано с какими-либо демографическими, клиническими и лабораторными характеристиками. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что

Адрес для переписки:
Пономарева Марина Владиславовна
620076, Россия, г. Екатеринбург, ул. Щербакова, 8,
ГБУ СО УрНИИДВиИ.
Тел.: 8 904 541-42-48. Факс: 8 (343) 218-33-71.
E-mail: marpo08@mail.ru

Contacts:
Marina V. Ponomareva
620076, Russian Federation, Yekaterinburg, Shcherbakova str., 8,
Urals Institute of Dermatovenereology and Immunopathology.
Phone: +7 904 541-42-48. Fax: +7 (343) 218-33-71.
E-mail: marpo08@mail.ru

Для цитирования:
Пономарева М.В., Левчик Н.К., Зильберберг Н.В. Неспецифический интратекальный синтез иммуноглобулинов у пациентов с сифилитической инфекцией // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 2. С. 309–318. doi: 10.15789/2220-7619-INI-2032

Citation:
Ponomareva M.V., Levchik N.K., Zilberberg N.V. Intrathecal nonspecific immunoglobulin synthesis in syphilitic infection // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 2, pp. 309–318. doi: 10.15789/2220-7619-INI-2032

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-INI-2032

частота неспецифических иммунных реакций в ЦНС при сифилитической инфекции соответствует частоте в общей популяции и отвергают гипотезу о возможности формирования полиспецифического интратекального синтеза антител при хронических нейроинфекциях.

Ключевые слова: *интратекальный синтез иммуноглобулинов, MRZ-реакция, нейросифилис, сифилис, антительный индекс, цереброспинальная жидкость, нейротропные вирусы.*

INTRATHECAL NONSPECIFIC IMMUNOGLOBULIN SYNTHESIS IN SYPHILITIC INFECTION

Ponomareva M.V., Levchik N.K., Zilberberg N.V.

Urals Institute of Dermatovenereology and Immunopathology, Yekaterinburg, Russia

Abstract. Intrathecal Ig synthesis is one of the characteristic laboratory features of neurosyphilis (caused by *Treponema pallidum* subspecies pallidum able to affect the central nervous system (CNS), but a persisting pathogen-driven immune response is problem of scar effect. This long-term Ig production within the CNS compartment even after timely and proper treatment remains unexplored. We hypothesized that a long-term current chronic inflammation in the CNS caused by syphilitic infection can be a trigger of nonspecific humoral immune response and the scar effect may result from non-specific B cell activation within the CNS in the absence of antigens. The MRZ reaction is a laboratory tool for detection of intrathecal nonspecific humoral immune reaction, which is poorly investigated in syphilis patient. The MRZ reaction (MRZR) is used as a marker of intrathecal nonspecific humoral immune response and is composed of the three antibody indices (AI) against neurotropic viruses: measles, rubella and varicella zoster virus. A positive MRZR, defined as an elevated AIs (> 1.5) against at least one or more viral agents, confirms diagnosis of a chronic or autoimmune disease involving CNS recently declared as a highly specific marker of multiple sclerosis. Insufficient data on neuroinfections motivated us to examine a hypothesis that a long-term chronic inflammation within the CNS compartment caused by syphilitic infection may be a trigger of intrathecal nonspecific humoral immune response. We assessed prevalence of positive MRZR in 147 patients with later-stage syphilis seropositive for MRZ viruses. Study group included 43 patients with first-time diagnosed neurosyphilis, 16 patients with a follow-up visit after neurosyphilis treatment, 88 patients with excluded neurosyphilis. There were no significant differences between categories of patients examined, and presence of positive MRZR was not associated with any demographic, clinical and laboratory characteristics. To sum up, our study (n = 147) showed that 27 patients (18%, 95% CI: 12–25%) were positive for intrathecal Ig production against one, two or three of the M, R, Z viruses, and bi- and tri-specific MRZR was present in 7 of 147 patients (5%, 95% CI: 2–10%). The data obtained evidence that frequency of the MRZR for syphilitic infection matches that of found in general population and a long-term current syphilitic infection affecting CNS seems to not be a trigger of a nonspecific intrathecal immune response. Among our patients, we also selected 43 patients with previously treated syphilitic infection without any neurological symptoms and excluded neurosyphilis diagnosis, so these patients can be considered as an apparently healthy group.

Key words: *intrathecal Ig synthesis, MRZ reaction, neurosyphilis, syphilis, antibody indices, cerebrospinal fluid, neurotropic viruses.*

Введение

Сифилис — инфекционное заболевание (возбудитель *Treponema pallidum* подвид *pallidum*), характеризующееся поражением всех органов и систем организма и волнообразной сменой активных проявлений периодами скрыто протекающей инфекции, длительное течение которого приводит к тяжелым и необратимым последствиям. Нейросифилис — общее название разнообразных клинических форм поражения нервной системы сифилитической этиологии. Длительный преклинический период, разнообразие клинических и нейровизулизационных проявлений нейросифилиса, включая неспецифические симптомы, существование асимптомных форм определяют важную роль лабораторного исследования цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) в диагностике нейросифилиса [3, 4, 5, 6].

В основе ликвородиагностики нейроинфекций лежит детекция иммунного ответа в забарьерном пространстве центральной нервной системы (ЦНС) [9]. Продукция иммуноглобулинов в пределах мозговых оболочек ЦНС (интратекальный синтез иммуноглобулинов) становится возможной при наличии в ЦНС очага хронического воспаления. В литературе описаны следующие возможные пути инициации антителопродукции [17]. Во-первых, это может быть результатом миграции В-клеток, находящихся в терминальной стадии дифференцировки (плазмоцитов), в места воспаления независимо от их антигенной специфичности и наличия сформированной эктопической лимфоидной ткани. Во-вторых, это может быть результатом Т-зависимой дифференциации В-клеток памяти в антителопродуцирующие клетки, сопровождающейся соматической гипермутацией Ig-генов. Данные процессы

происходят при воспалении в присутствии антигена на территории ЦНС и не требуют наличия организованной лимфоидной ткани. В-третьих, длительно существующие воспалительные инфильтраты образуют структуры, напоминающие по функции и архитектуре лимфатические узлы, — так называемые третичные лимфоидные органы [10]. Присутствие данных структур позволяют предположить возможность антигенной презентации инфекционного агента наивным Т- и В-лимфоцитам в непосредственной близости от места предполагаемого внедрения, предотвращая его диссеминацию. Регистрация в ЦСЖ В-клеточной популяции с фенотипом центробластов ($CD19^{+}$ $CD38^{high+}CD77^{+}Ki67^{+}Bcl\text{-}2^{-}$) [13], типичным для герминальных центров вторичных лимфоидных органов, подтверждает возможность данного механизма развития гуморального иммунного ответа на территории ЦНС. В-четвертых, В-клетки памяти могут дифференцироваться в антителопродуцирующие клетки в результате антигеннезависимой активации, при участии Т-клеток и Toll-рецепторов на В-клетках. В результате данной активации возможен интратекальный синтез антител различной специфичности одновременно [17]. Таким образом, суммируя вышесказанное, на территорию ЦНС В-лимфоциты попадают из системной циркуляции в основном на стадии дифференцировки плазмобластов или В-лимфоцитов памяти. В-клетки памяти могут дифференцироваться в антителопродуцирующие клетки под действием антигена в присутствии Т-лимфоцитов как на территории эктопической лимфоидной ткани (фолликулоподобные структуры), так и вне нее. Кроме того, возможна стимуляция дифференцировки В-клеток памяти в плазмобласты в отсутствие антигенов, при так называемой неспецифической активации.

Интратекальный синтез иммуноглобулинов имеет место при различных видах инфекционной и неинфекционной воспалительной патологии ЦНС [1, 2, 9, 19]. Несмотря на то что факт интратекального синтеза иммуноглобулинов не вызывает сомнений, природа и механизм длительной стимуляции плазматических клеток до сих пор не известны. Кроме того, неясна причина и клиническое значение факта длительно сохраняющегося интратекального синтеза иммуноглобулинов (от нескольких месяцев до нескольких лет) после терапии у части пациентов, в том числе после антибиотикотерапии («шрам-эффект») нейросифилиса [3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 19]. На сегодняшний день остается открытым вопрос о причинах данного феномена: является ли он следствием прямой антигенной стимуляции либо это результат неспецифических реакций на территории ЦНС.

Инструментом для детекции неспецифической стимуляции антител-продуцирующих клеток на территории ЦНС является так называемая MRZ-реакция, одновременный интратекальный синтез антител против нейротропных вирусов, таких как вирус кори (measles, M), краснухи (rubella, R) или варицелла-зостер вирус (varicella zoster virus, Z). Положительная MRZ-реакция в неврологии поддерживает диагностику хронического или аутоиммунного заболевания с участием ЦНС и является хорошо известным феноменом при рассеянном склерозе [2, 16]. Следует подчеркнуть, что выработка MRZ-антител не связана с интратекальной репликацией самих вирусов, что было подтверждено данными ПЦР-исследований ЦСЖ пациентов. Предполагается, что продукция этих антител является результатом повторной активации В-клеток памяти, специфичных к данным вирусам, и, таким образом, вторичный иммунный ответ отражает индивидуальный анамнез перенесенных заболеваний или вакцинаций [1].

Целью настоящего исследования являлось тестирование гипотезы о том, что длительно текущее хроническое воспаление в ЦНС, вызванное сифилитической инфекцией, может быть триггером неспецифического гуморального иммунного ответа, а феномен «серологического шрама» после перенесенного нейросифилиса может быть результатом неспецифической активации В-клеток ЦНС в отсутствие антигена.

Материалы и методы

Характеристика обследованных пациентов. В исследование были включены пациенты с сифилитической инфекцией, поступившие для проведения диагностической люмбальной пункции в отделении венерологии клиники УрНИИДВиИ с мая 2006 по август 2014 г. Показаниями для проведения диагностической пункции являлись: наличие неврологической симптоматики при любых формах сифилиса; нелеченые поздние формы сифилиса; неуточненный сифилис; отсутствие положительной динамики нетрепонемных серологических тестов в рекомендуемые сроки наблюдения после специфической терапии (серорезистентность); контроль лечения нейросифилиса. Все пациенты были проконсультированы неврологом и подписали информированное согласие. Парные образцы ЦСЖ и крови были собраны в один день. Часть ЦСЖ и сыворотки крови использовалась для проведения стандартных тестов, утвержденных приказами МЗ РФ и клиническими рекомендациями [6] для диагностики нейросифилиса, остатки образ-

цов аликвотировались и хранились при температуре −80°С. После завершения процесса набора образцы ЦСЖ и крови были подвергнуты углубленному исследованию. Из 200 парных образов были отобраны образцы пациентов с поздними формами сифилиса, а также имеющие достаточный для последующих исследований объем аликвот. Таким образом, из анализа были исключены две пары образцов пациентов с ранними формами сифилиса (< 2 года), одна пара образцов пациента с рассеянным склерозом, семь пар образцов пациентов с повторной люмбальной пункцией, а также 43 пары образцов по следующим техническим причинам: наличие контаминации образцов ЦСЖ с кровью (9), забор образцов крови и ЦСЖ в разные дни (5) и недостаточный объем образцов ЦСЖ (29). Окончательное число пациентов в обследуемой группе составило 147 человек. Основываясь на клинико-анамнестических и лабораторных данных диагноз «нейросифилис» был установлен 43 пациентам, исключен — 88 пациентам, 16 пациентов поступили для проведения контрольной люмбальной пункции после проведенного лечения нейросифилиса (7 месяцев — 5 лет).

Лабораторное исследование цереброспинальной жидкости и сыворотки крови. Всем пациентам были выполнены следующие диагностические тесты. Нетрепонемные тесты (НТТ): реакция микропреципитации (РМП), VDRL (Venereal Disease Research Laboratory)-тест, RPR (Rapid Plasma Reagin)-тест. Трепонемные тесты (ТТ): иммуноферментный анализ (ИФА), реакция пассивной гемагглютинации (РПГА), реакции иммунофлюоресценции в двух модификациях: с цельным ликвором (РИФц) и с абсорбцией антител к культуральным непатогенным трепонемам (штаммы V, VII, VIII, IX, Рейтера) (РИФабс). Для проведения всех вышеуказанных исследований использовались зарегистрированные в Российской Федерации диагностикумы и тест-системы.

Количественное определение содержания общих иммуноглобулинов и альбумина в ЦСЖ и сыворотке крови определяли нефелометрически (BN ProSpec, SiemensHelthcare/Dade Behring, Германия).

Количественное определение содержания антител класса G к антигенам вирусов кори (штамм «Edmonson»), краснухи (штамм HPV-77), варицелла-зостер (дикий штамм), *Treponema pallidum* (антигены p15, p17, p47, TmpA) проводили методом ИФА (Euroimmun, Германия). Для повышения точности соотношения концентраций образцы ЦСЖ и сыворотки были проанализированы в рамках одной аналитической серии с подбором соответствующего разведения биологических жидкостей [20].

Оценка интратекального синтеза вирус- и *Treponema pallidum*-специфических антител проводилась по методологии, предложенной H. Reiber [19]. Антительный индекс (АИ) для каждого вида антител рассчитывался как соотношение доли (Q = ЦСЖ/сыворотка) антител в ЦСЖ к доли суммарной фракции IgG в ЦСЖ (АИантител = Qантител/QIgG), либо АИ= Qантител/Qlim в случае, когда QIgG > Qlim, то есть соотношение общих иммуноглобулинов класса G превышало границу нормальных значений соотношений иммуноглобулинов при конкретном значении Qalb, где:

$$\mathrm{Qlim(IgG)} = 0{,}93 \cdot \sqrt{\mathrm{Qalb}^2 + 6 \cdot 10^{-6}} - 1{,}7 \cdot 10^{-3}.$$

Расчетное значение АИ для каждого вида антител ≥ 1,5 принималось за доказательство интратекального синтеза данных антител.

Статистические методы анализа. Статистический анализ данных проведен согласно общепринятым методам с использованием лицензионной программы Medcalc 12.2 (MedCalc Software bvba, Бельгия).

Количественные признаки приведены в виде медианы, минимальных и максимальных значений (мин–макс), для бинарных признаков приведены абсолютное количество и доля с 95% доверительным интервалом (95% ДИ) для доли. Сравнительный анализ количественных признаков выполнен с помощью критерия Манна–Уитни, качественных признаков — критерием Хи-квадрат. Для всех статистических критериев ошибка первого рода устанавливалась равной 0,05. Нулевая гипотеза (отсутствие различий) отвергалась, если вероятность (p) не превышала ошибку первого рода.

Результаты

Общая клинико-лабораторная характеристика пациентов. Среди 147 пациентов, включенных в исследование, было 90 мужчин и 57 женщин. Средний возраст составил 41,0± 9,8 лет (от 21 до 63 лет). У всех пациентов были положительные ТТ в сыворотке крови, у 130 из них были положительные результаты НТТ (средний титр RPR 1:8, диапазон титров от 1:1 до 1:512). 93 пациента ранее получали специфическую терапию сифилиса, в том числе 16 — высокими дозами пенициллина, рекомендуемыми для лечения нейросифилиса. При неврологическом обследовании у 63 пациентов были обнаружены неврологические и/или офтальмологические и/или психические симптомы или признаки. Семь пациентов были ВИЧ-инфицированными.

В результате обследования практически у всех пациентов в сыворотке крови были об-

наружены антитела к антигенам вируса кори (146/147), вируса краснухи (146/147) и вируса варицелла-зостер (145/147).

Интратекальный синтез общих IgM, IgG и IgA, оцененный по гиперболической формуле Рейбера [19], был обнаружен у 66 из 147 пациентов.

В целом в обследованной когорте (n = 147) 27 пациентов (18%, 95% ДИ: 12–25%) имели положительную MRZ-реакцию, то есть АИ ≥ 1,5 для одного, двух или трех вирусов. Из них у 41% пациентов (11/27) был констатирован интратекальный синтез антител к вирусу кори (M), у 22% пациентов (6/27) — к вирусу краснухи (R), несколько чаще констатировали синтез антител к вирусу варицелла-зостер (Z) (67%, 18/27), повышенные АИ *Treponema pallidum* были обнаружены у 109 из 147 пациентов (74%). Медиана повышенных значений АИ для *Treponema pallidum* значительно отличались от медиан для вирус-специфических АИ [*Treponema pallidum*-специфический АИ медиана (мин–макс) 13,4 (1,6–66,7) против кори АИ 2,2 (1,5–3,2), краснухи АИ 1,8 (1,5–3,0)) и варицелла-зостер АИ 2,2 (1,6–3,9); критерий Манна–Уитни, p < 0,001].

Одновременный синтез антител против двух или трех вирусов выявлен у 7 пациентов (5%, 95% ДИ: 2–10%). Были обнаружены следующие комбинации положительного интратекального синтеза вирус-специфических антител: M+R+ — в 1, R+Z+ — в 2, M+Z+ — в 3, M+R+Z+ — в 1 случае.

Для оценки зависимости позитивации MRZ-реакции от признаков поражения ЦНС, был проведен анализ в трех группах: I группа — пациенты с установленным диагнозом «нейросифилис» (НС) (n = 43), II группа — пациентов с исключенным диагнозом «нейросифилис» (неНС) (n = 88) и III группа — пациенты с контролем лечения нейросифилиса (к/лечНС) (n = 16). Интратекальный антивирусный иммунный ответ против по меньшей мере одного нейротропного вируса был обнаружен у 8 из 43 пациентов I группы (19%, 95% ДИ 9–34%), у 15 из 88 пациентов II группы (17%, 95% ДИ 10–27%), у 4 из 16 пациентов III группы (25%, 95% ДИ: 7–52%) (p = 0,474) (табл. 1). Повышенные АИ против двух или более вирусов были обнаружены у 1 из 43 (2%, 95% ДИ 0–12%) пациентов в I группе, у 5 из 88 (6%, 95% ДИ: 2–13%) во II группе, у 1 из 16 (6%, 95% ДИ: 2–13%) в III группе (p = 0,824). Подробная информация об обнаруженных комбинациях повышенных АИ приведена в табл. 1.

Для идентификации признаков, связанных с позитивацией MRZ-реакции, все 147 пациентов были разделены на две группы: MRZ-отрицательные (n = 120) и MRZ-положительные (n = 27), проведен сравнительный анализ по следующим параметрам: эпидемиологические данные (пол, возраст, наличие специфической терапии сифилиса в анамнезе); клинические признаки (наличие неврологических симптомов); интратекальный гуморальный иммунный ответ (наличие интратекального синтеза общих Ig и *Treponema pallidum*-специфических антител, АИ > 1,5). Результаты сравнения в этих группах пациентов приведены в табл. 2. Статистически значимых различий между группами по всем сравниваемым признакам обнаружено не было.

Обсуждение

На сегодняшний день по обобщенным данным мировой литературы, посвященной этому вопросу, включая обзорную статью, известно лишь о частоте позитивации MRZ-реакции лишь у 11 пациентов с нейросифилисом [14, 16, 21, 22]. В результате данного исследования были получены новые данные о частоте встречаемости позитивации MRZ-реакции при поздних формах сифилитической инфекции. Это первое исследование MRZ-реакции у 147 пациентов с поздним формами сифилиса, в том числе 43 пациентов с нейросифилисом. Были получены данные, свидетельствующие о том, что неспецифическая стимуляция интратекального синтеза антител присутствует независимо от наличия лабораторного подтверждения поражения ЦНС при сифилитической инфекции. Так положительная MRZ-реакция, определяемая как повышенные АИ (≥ 1,5) против одного или нескольких вирусных агентов, была обнаружена примерно у каждого пятого пациента как с установленным, так и с исключенным диагнозом «нейросифилис», и у каждого 4 пациента с контролем лечения нейросифилиса (19, 17 и 25% соответственно, p = 0,474). Одновременный синтез антител к двум (биспецифическая MRZ-реакция) и трем (триспецифическая MRZ-реакция) вирусам регистрировался значительно реже (2, 6 и 6% соответственно, p = 0,824), лишь у одного пациента с исключенным диагнозом «нейросифилис» регистрировали синтез антител ко всем трем вирусам (1/147, 0,7%).

У пациентов с сифилисом повышенные значения АИ против специфического антигена *Treponema pallidum* регистрировались значительно чаще и имели более высокие абсолютные значения, чем повышенные значения АИ против вирусов. Это наблюдение соответствует другим исследованиям [15, 18, 19] и, с иммунологической точки зрения, подтверждает, что интратекально синтезируемые вирусные антитела являются следствием неспецифического гуморального иммунного ответа ЦНС.

Таблица 1. Комбинации повышенных значении антительных индексов различной специфичности
Table 1. Combinations of elevated varying specificity antibody indices

		Группы Groups			p
		I НС/NS n = 43	II неНС/noNS n = 88	III к/леч НС | NSt/fl n = 16	
Комбинации повышенных АИ (≥ 1,5) Combinations of elevated AI (≥ 1,5)					
Tp+	абс./abs.	34	41	12	
Tp+ M+	абс./abs.	3	2	0	
Tp+R+	абс./abs.	1	0	1	
Tp+Z+	абс./abs.	3	3	2	
Tp+M+Z+	абс./abs.	0	3	0	
Tp+M+R+	абс./abs.	0	0	1	
Tp+R+Z+	абс./abs.	1	1	0	
Tp+M+R+Z+	абс./abs.	0	1	0	
M+	абс./abs.	0	1	0	
Z+	абс./abs.	0	4	0	
MRZ-реакция MRZ reaction					
Позитивная * Positive*	абс./abs.	8	15	4	0,474
	%	19	17	25	
	95% ДИ(%) 95% CI(%)	9–34	10–27	7–52	
Моноспецифичная** Monospecific**	абс./abs.	7	10	3	0,410
	%	16	11	19	
	95% ДИ(%) 95% CI(%)	7–30	5–19	4–46	
Би- и триспецифичная*** Bi- and trispecific***	абс./abs.	1	5	1	0,824
	%	2	6	6	
	95% ДИ(%) 95% CI(%)	0–12	2–13	0–30	
$АИ_{Measles} \geq 1,5$ $AI_{Measles} \geq 1,5$	абс./abs.	3	7	1	0,881
	%	7	8	6	
	95% ДИ(%) 95% CI(%)	1–19	3–16	0–30	
$АИ_{Rubella} \geq 1,5$ $AI_{Rubella} \geq 1,5$	абс./abs.	2	2	2	0,242
	%	5	2	13	
	95% ДИ(%) 95% CI(%)	1–16	0–8	2–39	
$АИ_{Varicella\ Zoster} \geq 1,5$ $AI_{Varicella\ Zoster} \geq 1,5$	абс./abs.	4	12	2	0,758
	%	9	14	13	
	95% ДИ(%) 95% CI(%)	2–22	7–23	2–39	

Примечания. MRZ-реакция — интратекальный синтез антител против вирусов кори measles (M+), краснухи rubella (R+), и варицела-зостер zoster (Z+); НС — нейросифилис; неНС — пациенты с исключенным диагнозом «нейросифилис»; к/лечНС — контроль лечения нейросифилиса; АИ, антительный индекс; Tp — *Treponema pallidum*; ДИ- доверительный интервал; * АИ ≥ 1,5 как минимум к одному или более вирусам; АИ ≥ 1,5 для вируса кори (M+), краснухи (R+), варицелла-зостер (Z+) viruses; **АИ ≥1,5 для одного из трех нейротропных вирусов; ***АИ ≥ 1,5 для двух или трех нейротропных вирусов.

Notes. MRZ reaction — an intrathecal synthesis of immunoglobulins against measles (M+), rubella (R+), and zoster (Z+) viruses; NS — neurosiphilis; noNS — excluded neurosyphilis; NSt/fl — neurosyphilis treatment follow-up; AI — antibody indices; Tp — *Treponema pallidum*; CI — confidence interval. *positive — defined as elevated AIs (≥ 1.5) against at least one or more viral agents; **monospecific — defined as elevated AIs (≥ 1.5) against one viral agents; ***bi- and trispecific — defined as elevated antibody indexes (AIs) (≥ 1.5) against two or three viral agents.

Таблица 2. Характеристики групп пациентов в зависимости от позитивации MRZ-реакции
Table 2. Characteristics of patient groups depending on the positive MRZ reaction

Характеристики Characteristics	**MRZ-реакция отрицательная** Negative MRZ reaction	**MRZ-реакция положительная** Positive MRZ reaction			**Сравнение, p** Comparison, p	
	MRZ 0 n = 120	**MRZ 1** n = 20	**MRZ 2–3** n = 7	**Всего MRZ 1–3** Total MRZ 1–3 n = 27		
	(1)	**(2)**	**(3)**	**(4)**	**(1),(2),(3)**	**(1) vs (4)**
Пол: Sex:						
мужчины males	76 (64%)	10 (50%)	4 (57%)	14 (52%)	0,513	0,374
женщины females	44 (37%)	10 (50%)	3 (43%)	13 (48%)		
Возраст, год [медиана (мин-мах)] Age, years [median (min-max)]	42 (23–63)	41 (24–53)	41 (21–52)	41 (21–53)	0,807	0,715
Специфическая терапия в анамнезе, из них: Syphilis treatment before study entry:						
нет no	27 (23%)	4 (20%)	0 (0%)	4 (15%)	0,496	0,250
есть, по схемам лечения неневрологического сифилиса no history of nonneurological syphilis treatment	77 (64%)	11 (55%)	5 (71%)	16 (59%)		
есть, по схемам лечения нейросифилиса follow-up visit after neurosyphilis treatment	12 (10%)	3 (15%)	1 (14%)	4 (15%)		
неизвестно unknown	4 (3%)	2 (10%)	1 (14%)	3 (11%)		
Наличие неврологических/ офтальмологических/ психиатрических отклонений Neurological and/or ophthalmologic and/or psychiatric symptoms or signs	54 (45%)	5 (25%)	4 (57%)	9 (33%)	0,182	0,373
ИТС общих Ig IS total Ig	54 (45%)	10 (50%)	2 (29%)	12 (44%)	0,616	0,872
АИ Tp ≥ 1,5 AI Tp ≥ 1,5	87 (73%)	15 (75%)	7 (100%)	22 (81%)	0,270	0,472
АИ Т.р. ≥ 1,5 [медиана (мин-мах)] AI T.p. ≥ 1,5 [median (min-max)]	13,5 (1,6–66,9)	9,1 (2,9–49,7)	8,5 (2,3–35,7)	9,2 (2,3–49,7)	0,823	0,618
ВИЧ-инфекция HIV-infected	6 (5%)	1 (4%)	0 (0%)	1 (4%)	0,832	0,830

Примечания. АИ — антительный индекс; ИТС общих Ig — интратекальный синтез общих иммуноглобулинов — определен с использованием гиперболической формулы Райбера для классов A, M, G [19]; MRZ отрицат. (MRZ 0) — АИ ≥ 1,5 ко всем трем нейротропным вирусам; MRZ1 — АИ ≥ 1,5 для одного из трех нейротропных вирусов; MRZ2–3 — АИ ≥ 1,5 для двух или трех нейротропных вирусов; MRZ1–3 — АИ ≥ 1,5 для одного, двух или трех нейротропных вирусов.

Notes. AI — antibody index; IS total Ig — intrathecal total (A,M, G) immunoglobulins synthesis estimated by Reiber's hyperbolic formula [19]; Tp — *Treponema pallidum*; M — measles virus; R — rubella virus; Z- varicella zoster virus; MRZ reaction negative (MRZ 0) — AI ≥ 1,5 against three viral agents; MRZ1 — АИ ≥ 1,5 defined as elevated AIs (≥ 1.5) against one viral agents; MRZ2–3 — defined as elevated AIs (≥ 1.5) against two or three viral agents; MRZ1–3 — (total) defined as elevated AIs (≥ 1.5) against at least one or more viral agents.

С другой стороны, тот факт, что положительная MRZ-реакция присутствует у пациентов с сифилисом, является интересным, поскольку он может указывать на наличие благоприятной среды, способствующей повторной активации В-клеток памяти. Тем не менее не было обнаружено различий по частоте и абсолютным величинам АИ *Treponema pallidum*, свидетельствующих о специфическом синтезе антител у пациентов в зависимости от позитивности MRZ-реакции. Таким образом, в данном исследовании не было получено значимых ассоциаций между неспецифическим и специфическим интратекальным синтезом антител.

Считается, что хронические воспалительные состояния ЦНС связаны с наличием неспецифического привлечения циркулирующих в системном кровотоке плазмобластов и плазматических клеток, последние, получая доступ к нишам выживания, созревания и пролиферации в очаге воспаления ЦНС, определяют спектр синтезируемых антител. Поэтому представляется логичным, что в ходе заболевания инфицирование трепонемой ЦНС обуславливает повреждение и формирование у пациентов воспалительной реакции ЦНС, однако последующая терапия должна препятствовать распространению возбудителя и снижать интенсивность иммуновоспалительной реакции, тем самым устраняя условия для синтеза и расширения спектра антител в отсутствие *Treponema pallidum* [11]. Данное исследование показало, что предыдущая антимикробная терапия сифилиса/нейросифилиса, а также признаки поражения ЦНС, по-видимому, не влияют на позитивность MRZ-реакции, указывая на то, что формирование MRZ-реакции происходит до или на начальных стадиях заболевания. Тот факт, что MRZ-реакция не ассоциирована с возрастом и полом, с неврологическими симптомами, специфической терапией сифилиса, так же как и с интратекальным синтезом общих Ig и *Treponema pallidum*-специфических антител, что было установлено в данном исследовании, а также ранее опубликованные данные о наличии моноспецифической MRZ-реакции (повышенный АИ к одному нейротропному вирусу) у 15 из 99 (15%) здоровых добровольцев [23], свидетельствуют о том, что частота MRZ-реакции при сифилитической инфекции соответствует частоте в общей популяции.

С диагностической точки зрения, би- и триспецифическая MRZ-реакция существенно увеличивает вероятность диагностики рассеянного склероза (РС) [2,16]. В данном исследовании у всех пациентов, согласно неврологическому обследованию, не было никаких клинических признаков, необходимых для постановки диагноза РС. С другой стороны, положительная MRZ-реакция также отмечалась у нескольких пациентов с аутоиммунными расстройствами ЦНС. Согласно этим данным, у 5% обследованных пациентов с сифилисом нельзя исключить аутоиммунный процесс, поскольку хроническая иммунная стимуляция присуща аутоиммунным заболеваниям. В настоящее время, однако отсутствуют прямые доказательства аутоиммунного поражения ЦНС при сифилисе. Учитывая тот факт, что феномен MRZ-реакции мало изучен [1, 11], необходимо провести дальнейшее наблюдение за пациентами с положительной MRZ-реакцией и исследования, для изучения вероятности развития этих расстройств ЦНС у пациентов с поздними формами сифилитической инфекции.

Заключение

Установлено, что длительно текущая сифилитическая инфекция, в том числе с лабораторными признаками нейросифилиса, не является триггером неспецифического гуморального иммунного ответа на территории ЦНС, а неспецифические иммунные реакции ЦНС встречаются у 5% пациентов, независимо от наличия проведенной ранее специфической терапии, неврологических расстройств, пола, возраста, частоты и выраженности интратекального синтеза специфических антител. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что частота неспецифических иммунных реакций в ЦНС при сифилитической инфекции соответствует частоте в общей популяции и отвергают гипотезу о возможности формирования полиспецифического интратекального синтеза антител при хронических нейроинфекциях.

Список литературы/References

1. Макшаков Г.С., Лапин С.В., Евдошенко Е.П. Современные представления об интратекальном гуморальном иммунном ответе и диагностическое значение выявления олигоклональных иммуноглобулинов при рассеянном склерозе // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2016. № 116 (2). С. 14–20. [Makshakov G.S., Lapin S.V., Evdoshenko E.P. Current concepts on intrathecal humoral immune response and diagnostic importance of oligoclonal immunoglobulins in multiple sclerosis. *Zhurnal nevrologii i psikhiatrii im. S.S. Korsakova = The Korsakov's Journal of Neurology and Psychiatry, 2016, no. 116 (2), pp. 14–20. (In Russ.)*] *doi: 10.17116/jnevro20161162214-20*

2. Мошникова А.Н., Максимчук В.К., Лапин С.В., Назаров В.Д., Суркова Е.А., Новиков С.А., Макшаков Г.С., Крутецкая И.Ю., Краснов В.С., Кушнир Я.Б., Неофидов Н.А., Тотолян Н.А., Скоромец А.А., Евдошенко Е.П., Тотолян Арег А. Диагностическая значимость интратекального синтеза иммуноглобулинов против нейротропных вирусов (MRZ-реакция) в диагностике рассеянного склероза // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 5–6. С. 703–712. [Moshnikova A.N., Maksimchuk V.K., Lapin S.V., Nazarov V.D., Surkova E.A., Novikov S.A., Makshakov G.S., Krutetskaya I.Yu., Krasnov V.S., Kushnir Ya.B., Neofidov N.A., Totolian N.A., Skoromets A.A., Evdoshenko E.P., Totolian Areg A. Diagnostic significance of intrathecally synthesized immunoglobulins against neurotropic viruses (MRZ-reaction) in diagnosis of multiple sclerosis. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2019, vol. 9, no. 5–6, pp. 703–712. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-703-712*
3. Нейросифилис. Современные представления о диагностике и лечении: руководство для врачей / Под ред. А.В. Самцова. СПб.: СпецЛит. 2006. 127 с. [Neurosyphilis. Modern views on diagnosis and treatment: a guide for physicians. Ed. Samtsov A.V. *St. Petersburg: SpetsLit, 2006. 127 p. (In Russ.)*]
4. Родиков М.В., Прохоренков В.И. Нейросифилис: от диагноза к лечению Часть I. Эпидемиология, патогенез, клиника // Вестник дерматологии и венерологии. 2010. Т. 86, № 1. С. 28–34. [Rodikov M.V., Prokhorenkov V.I. Neurosyphilis: from the diagnosis to treatment. Part I. The epidemiology, pathology and clinic. *Vestnik dermatologii i venerologii = Vestnik Dermatologii i Venerologii, 2010, vol. 86, no. 1, pp. 28–34. (In Russ.)] doi: 10.25208/vdv808*
5. Родиков М.В., Прохоренков В.И. Нейросифилис: от диагноза к лечению Часть I.I. Диагностика, терапия, прогноз // Вестник дерматологии и венерологии. 2010. Т. 86, № 2. С. 20–25. [Rodikov M.V., Prokhorenkov V.I. Neurosyphilis: from the diagnosis to treatment Part I.I. Diagnostics, therapy and prognosis. *Vestnik dermatologii i venerologii = Vestnik Dermatologii i Venerologii, 2010, vol. 86, no. 2, pp. 20–25. (In Russ.)] 10.25208/vdv892*
6. Российское общество дерматовенерологов и косметологов. Ведение больных инфекциями, передаваемыми половым путем, и урогенительными инфекциями: клинические рекомендации. М.: Деловой Экспресс, 2012. С. 34–68. [Russian Society of Dermatovenerologists and Cosmetologists. Management of patients with sexually transmitted infections and urogenital infections: clinical guidelines. *Moscow: Delovoi Ekspress, 2012, pp. 34–68. (In Russ.)*]
7. Соколовский Е., Фриго Н., Ротанов С., Савичева А., Доля О., Китаева Н., Халлен А., Унемо М., Домейка М., Баллард Р. Руководство по лабораторной диагностике сифилиса в странах восточной Европы // Вестник дерматологии и венерологии. 2008. № 5. С. 87–96. [Sokolovskiy E., Frigo N., Rotanov S., Savicheva A., Dolya O., Kitajeva N., Hallen A., Unemo M., Domeika M., Ballard R. Guidelines for the laboratory diagnosis of syphilis in East-European countries. *Vestnik dermatologii i venerologii = Vestnik Dermatologii i Venerologii, 2008, no. 5, pp. 87–96. (In Russ.)*]
8. Фриго Н.В., Катунин Г.Л., Ротанов С.В., Левин О.С. Современные иммунологические методы исследования цереброспинальной жидкости у больных нейросифилисом // Вестник дерматологии и венерологии. 2011. № 6. С. 49–57. [Frigo N.V., Katunin G.L., Rotanov S.V., Levin O.S. Up-to-date immunology methods for examination of the cerebrospinal fluid in patients suffering from neurosyphilis. *Vestnik dermatologii i venerologii = Vestnik Dermatologii i Venerologii, 2011, no. 6, pp. 49–57. (In Russ.)*]
9. Хронические нейроинфекции / Под ред. И.А. Завалишина, Н.Н Спирина, А.Н. Бойко, С.С. Никитина. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 560 с. [Chronic neuroinfections. Eds. I.A. Zavalishina, N.N Spirina, A.N. Bojko, S.S. Nikitina. *Moscow: GEOTAR-Media, 2011. 560 p. (In Russ.)*]
10. Aloisi F., Pujol-Borrell R. Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol., 2006, vol. 6, no. 3, pp. 205–217. doi: 10.1038/nri1786*
11. Bonnan M. Does disease-irrelevant intrathecal synthesis in multiple sclerosis make sense in the light of tertiary lymphoid organs? *Front. Neurol., 2014, vol. 5: 27. doi: 10.3389/fneur.2014.00027*
12. Caudie C., Garel F., Bancel J., Lombard C., Vandenberghe N. [Diagnosis and biological monitoring of 6 neurosyphilis cases: value of cerebrospinal fluid analysis]. *Ann. Biol. Clin. (Paris), 2003, vol. 61, no. 5, pp. 563–569. (In French)*
13. Corcione A., Casazza S., Ferretti E., Giunti D., Zappia E., Pistorio A., Gambini C., Mancardi G.L., Uccelli A., Pistoia V. Recapitulation of B cell differentiation in the central nervous system of patients with multiple sclerosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA, 2004, vol. 101, no. 30, pp. 11064–11069. doi: 10.1073/pnas.0402455101*
14. Felgenhauer K., Schädlich H.J., Nekic M., Ackermann R. Cerebrospinal fluid virus antibodies. A diagnostic indicator for multiple sclerosis? *J. Neurol. Sci., 1985, vol. 71, no. 2–3, pp. 291–299. doi: 10.1016/0022-510x(85)90067-x*
15. Jacobi C., Lange P., Reiber H. Quantitation of intrathecal antibodies in cerebrospinal fluid of subacute sclerosing panencephalitis, herpes simplex encephalitis and multiple sclerosis: discrimination between microorganism-driven and polyspecific immune response. *J. Neuroimmunol., 2007, vol. 187, no. 1–2, pp. 139–146. doi: 10.1016/j.jneuroim.2007.04.002*
16. Jarius S., Eichhorn P., Franciotta D., Petereit H.F., Akman-Demir G., Wick M., Wildemann B. The MRZ reaction as a highly specific marker of multiple sclerosis: re-evaluation and structured review of the literature. *J. Neurol., 2017, vol. 264, no. 3, pp. 453–466. doi: 10.1007/s00415-016-8360-4*
17. Meinl E., Krumbholz M., Hohlfeld R. B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation. *Ann. Neurol., 2006, vol. 59, no. 6, pp. 880–892. doi: 10.1002/ana.20890*
18. Otto C., Hofmann J., Finke C., Zimmermann M., Ruprecht K. The fraction of varicella zoster virus-specific antibodies among all intrathecally-produced antibodies discriminates between patients with varicella zoster virus reactivation and multiple sclerosis. *Fluids Barriers CNS, 2014, vol. 11, no. 1: 3. doi: 10.1186/2045-8118-11-3*
19. Reiber H., Peter J.B. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J. Neurol. Sci., 2001, vol. 184, no. 2, pp. 101–22. doi: 10.1016/s0022-510x(00)00501-3*
20. Reiber H., Thompson E.J., Grimsley G., Bernardi G., Adam P., Monteiro de Almeida S., Fredman P., Keir G., Lammers M., Liblau R., Menna-Barreto M., Sá M.J., Seres E., Sindic C.J., Teelken A., Trendelenburg C., Trojano M., van Antwerpen M.P., Verbeek M.M. Quality assurance for cerebrospinal fluid protein analysis: international consensus by an Internet-based group discussion. *Clin. Chem. Lab. Med., 2003, vol. 41, no. 3, pp. 331–337. doi: 10.1515/CCLM.2003.053*

21. Reiber H., Ungefehr S., Jacobi C. The intrathecal, polyspecific and oligoclonal immune response in multiple sclerosis. *Mult. Scler., 1998, vol. 4, no. 3, pp. 111–117. doi: 10.1177/135245859800400304*
22. Sindic C.J., Monteyne P., Laterre E.C. The intrathecal synthesis of virus-specific oligoclonal IgG in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol., 1994, vol. 54, no. 1–2, pp. 75–80. doi: 10.1016/0165-5728(94)90233-x*
23. Wurster U., Stachan R., Windhagen A., Petereit H.F., Markus Leweke F. Reference values for standard cerebrospinal fluid examinations in multiple sclerosis. Results from 99 healthy volunteers. *Multiple Sclerosis, 2006, pp. S62–S62.*

Авторы:
Пономарева М.В., к.б.н., старший научный сотрудник научно-экспериментального лабораторного отдела ГБУ Свердловской области Уральский научно-исследовательский институт дерматовенерологии и иммунопатологии, г. Екатеринбург, Россия;
Левчик Н.К., к.м.н., доцент, зав. научным клиническим отделом сифилидологии и ИППП ГБУ Свердловской области Уральский научно-исследовательский институт дерматовенерологии и иммунопатологии, г. Екатеринбург, Россия;
Зильберберг Н.В., д.м.н., профессор, зам. директора по научной работе ГБУ Свердловской области Уральский научно-исследовательский институт дерматовенерологии и иммунопатологии, г. Екатеринбург, Россия.

Authors:
Levchik N.K., PhD (Medicine), Associate Professor, Head of the Scientific and Clinical Department of Syphilidology and STD, Urals Institute of Dermatovenereology and Immunopathology, Yekaterinburg, Russian Federation;
Ponomareva M.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Laboratory Medicine, Urals Institute of Dermatovenereology and Immunopathology, Yekaterinburg, Russian Federation;
Zilberberg N.V., DSc (Medicine), Professor, Deputy Director of the Urals Institute of Dermatovenereology and Immunopathology, Yekaterinburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 16.09.2022
Принята к печати 25.02.2023

Received 16.09.2022
Accepted 25.02.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 2, pp. 319–328

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 2, с. 319–328

ОЦЕНКА ФОРМИРОВАНИЯ И НАПРЯЖЕННОСТИ АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА У ПЕРЕБОЛЕВШИХ COVID-19

И.А. Иванова[1], А.В. Филиппенко[1], А.А. Труфанова[1], Н.Д. Омельченко[1], О.С. Чемисова[1], А.С. Водопьянов[1], Е.А. Березняк[1], Е.П. Соколова[1], А.К. Носков[1], А.А. Тотолян[2]

[1] *ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия*
[2] *ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия*

Резюме. Изучение адаптивного иммунитета у перенесших новую коронавирусную инфекцию является важной задачей, так как нет единого мнения, влияет ли на формирование и напряженность иммунного ответа к COVID-19 степень тяжести перенесенного заболевания. Проведена сравнительная оценка наличия и длительности сохранения клеточного и гуморального иммунитета у перенесших COVID-19 разной степени тяжести. В исследовании принимали участие волонтеры, переболевшие новой коронавирусной инфекцией бессимптомно (n = 30), в средней степени тяжести (n = 21) и в тяжелой форме (n = 12). Средний возраст обследуемых составил 47,3±12,5 года. О формировании клеточного иммунитета судили по увеличению синтеза IFNγ в ответ на стимуляцию лимфоцитов в течение 16–20 ч гликопротеином S(RBD) возбудителя COVID-19. Для определения продукции IFNγ использовали тест–систему «гамма-Интерферон-ИФА-БЕСТ», производства АО «Вектор-Бест», Россия. Гуморальный иммунный ответ регистрировали, выявляя антитела класса G с помощью тест-системы «SARS-CoV-2RBD-ИФА-Гамалеи» (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России). Выявлено, что у всех переболевших формируется гуморальный и клеточный иммунитет к SARS-CoV-2. Однако количество лиц с адаптивным иммунитетом к COVID-19 и длительность его сохранения зависит от тяжести перенесенной инфекции. Значительное снижение числа лиц, имеющих клеточный иммунитет, было выявлено в группе тяжелопереболевших. У большинства волонтеров этой группы регистрировалось наличие иммуноглобулинов класса G до окончания наблюдения. В рамках этой группы, в отличие от двух других, не были выявлены пациенты, у которых активировалось только клеточное звено иммунного ответа. Волонтеры, у которых не сохранился адаптивный иммунитет к возбудителю COVID-19, появились только к концу срока наблюдения. Среди перенесших заболевание в средней форме через 7–8 месяцев после выздоровления наблюдалось уменьшение числа лиц, имеющих клеточный и гуморальный иммунитет. Этот процесс начался раньше, чем в группе болевших бессимптомно и продолжался до конца исследования. Увеличивалась доля лиц с клеточным иммунитетом, а в более поздние сроки — с гуморальным иммунным ответом. К концу исследования сохранялся высокий процент волонтеров, перенесших инфекцию бессимптомно, имеющих клеточный и гуморальный иммунитет к SARS-CoV-2. Их количество оставалось статистически выше, чем в группе перенесших новую коронавирусную инфекцию средней степени тяжести, но ниже, чем в группе болевших тяжело. В этой группе к окончанию эксперимента регистрировалось увеличение числа волонтеров с только клеточным иммунным ответом. В конце срока наблюдения число волонтеров, имеющих

Адрес для переписки:
Иванова Инна Александровна
344002, Россия, г. Ростов-на-Дону, ул. Максима Горького, 117/40, ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (863) 240-91-22. Факс: 8 (863) 267-02-23.
E-mail: ivanova_ia@antiplague.ru

Contacts:
Inna A. Ivanova
344002, Russian Federation, Rostov-on-Don, Maxim Gorky str., 117/40, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor.
Phone: +7 (863) 240-91-22. Fax: +7 (863) 267-02-23.
E-mail: ivanova_ia@antiplague.ru

Для цитирования:
Иванова И.А., Филиппенко А.В., Труфанова А.А., Омельченко Н.Д., Чемисова О.С., Водопьянов А.С., Березняк Е.А., Соколова Е.П., Носков А.К., Тотолян А.А. Оценка формирования и напряженности адаптивного иммунитета у переболевших COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 2. С. 319–328. doi: 10.15789/2220-7619-AOF-2107

Citation:
Ivanova I.A., Filippenko A.V., Trufanova A.A., Omelchenko N.D., Chemisova O.S., Vodopyanov A.S., Bereznyak E.A., Sokolova E.P., Noskov A.K., Totolian A.A. Assessment of formation and durability of adaptive immunity in COVID-19 convasescents // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 2, pp. 319–328. doi: 10.15789/2220-7619-AOF-2107

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-AOF-2107

гуморальный иммунитет к возбудителю новой коронавирусной инфекции, оставалось выше, по сравнению с теми, у кого регистрируется клеточный иммунный ответ.

Ключевые слова: *SARS-CoV-2, COVID-19, иммунный ответ, клеточный иммунитет, гуморальный иммунитет, иммуноглобулины.*

ASSESSMENT OF FORMATION AND DURABILITY OF ADAPTIVE IMMUNITY IN COVID-19 CONVASESCENTS

Ivanova I.A.[1], Filippenko A.V.[1], Trufanova A.A.[1], Omelchenko N.D.[1], Chemisova O.S.[1], Vodopyanov A.S.[1], Bereznyak E.A.[1], Sokolova E.P.[1], Noskov A.K.[1], Totolian A.A.[2]

[1] *Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russian Federation*
[2] *St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation*

Abstract. The study of adaptive immunity in COVID-19 convalescent patients is important, because no consensus on whether the disease severity affects formation and durability of COVID-19 immune response has been achieved. A comparative assessment of emergence and durability of sustained cellular and humoral immunity in convalescent patients with COVID-19 of varying severity was carried out. The study involved volunteers with asymptomatic (n = 30), moderate (n = 21) and severe (n = 12) COVID-19. The average age of the subjects was 47.3±12.5 years. The formation of cellular immunity was assessed by increased IFNγ production in response to 16–20 hour-long SARS-CoV-2-derived glycoprotein S (RBD) lymphocyte stimulation. To measure IFNγ level, the Gamma Interferon–IFA-BEST test system manufactured by Vector-Best JSC, Russia, was used. The humoral immune response was recorded by detecting SARS-CoV-2RBD-specific class G antibodies using the "SARS-CoV-2RBD-ELISA-Gamalei" test system (FSBI "NITSEM N.F. Gamalei" of the Ministry of Health of Russia). It was revealed that humoral and cellular immunity against SARS-CoV-2 proteins was formed in all COVID-19 convalescent patients. However, the number of subjects with adaptive immunity to COVID-19 and the duration of its preservation depends on the severity of the infection. A significant decrease in the number of subjects with cellular immunity was revealed in the group of severe COVID-19. Most of the volunteers in this group had class G immunoglobulins before the end of the follow-up. In this group, unlike the other two, no patients were identified in whom only the cellular arm of the immune response was activated. Volunteers who did not retain adaptive immunity to the COVID-19 pathogen appeared only by the end of the follow-up period. Among those recovered after moderate disease 7–8 months later there was a decrease in the number of people with cellular and humoral immunity. This process started earlier than in the group of patients who were asymptomatic and continued until the end of the study. The proportion of individuals with cellular immunity increased, and at later timepoint — with humoral immune response. By the end of the study, a high percentage of volunteers remained asymptomatically infected, having cellular and humoral immunity to SARS-CoV-2. Their number remained significantly higher than in the group of moderate COVID-19, but lower than in severe COVID-19. By the end of the study, an increased number of volunteers with solely cellular immune response was recorded in this group. At the end of the follow-up period, the number of volunteers with humoral immunity against SARS-CoV-2 remained higher compared to those with a cellular immune response.

Key words: *SARS-CoV-2, COVID-19, immune response, cellular immunity, humoral immunity, immunoglobulins.*

Введение

Защита от инфекции может быть опосредована несколькими механизмами: с одной стороны, элиминацию патогена обеспечивают нейтрализующие антитела, с другой, доказано, что антигенспецифические эффекторные Т-клетки являются необходимыми компонентами иммунного ответа на респираторные вирусы [29].

SARS-CoV-2 индуцирует антигенспецифический гуморальный иммунный ответ, при котором регистрируется ранний всплеск продукции сывороточных антител. В течение четырех месяцев наблюдается резкое уменьшение количества иммуноглобулинов, затем снижение замедляется. Продукция антител поддерживается долгоживущими плазматическими клетками костного мозга, которые обнаруживаются и через одиннадцать месяцев после заражения [33].

Другими авторами показано, что у переболевших стабильные уровни анти-N и анти-RBD/S1 иммуноглобулинов регистрируются в течение восьми [12], и даже до девяти месяцев, независимо от возраста, пола, групп крови, клинической симптоматики и тяжести перенесенного заболевания [2].

Описана нейтрализующая способность анти-SARS-CoV-2 антител через девять месяцев после заражения [26], а также в течение десяти месяцев после выздоровления у большинства пациентов с легким течением COVID-19 [34].

Наряду с гуморальным иммунным ответом, у больных COVID-19 регистрируется активация клеточного звена иммунитета [24, 27, 28]. Т-клеточный ответ к SARS-CoV-2 был

выявлен более чем у 97% выздоравливающих пациентов [5]. О важности специфического Т-клеточного иммунного ответа при COVID-19 свидетельствует тот факт, что раннее формирование антигенспецифических клонов лимфоцитов коррелирует с уменьшением вирусной нагрузки и тяжести заболевания [30], а низкое количество Т-клеток памяти, наряду со снижением регуляторных популяций Т-лимфоцитов, может усугублять воспалительную реакцию, приводящую к цитокиновому шторму, и, следовательно, повреждению тканей и органной недостаточности [25].

Известно, что В- и Т-клетки памяти у выздоровевших людей могут сохраняться достаточно долго, в то время как уровень нейтрализующих антител со временем уменьшается [3].

Однако нет единого мнения влияет ли на формирование и напряженность иммунного ответа к COVID-19 степень тяжести перенесенного заболевания.

Показано, что при легком течении COVID-19 наблюдается активация Т-клеточного звена иммунитета, образование популяции Т-клеток памяти на фоне низкой продукции антител [11, 32]. У пациентов при тяжелом и длительном заболевании вырабатываются и антитела, и Т-клеточный ответ, причем величина этих двух факторов часто коррелирует с тяжестью инфекции [23]. В то же время описано, что антигенспецифические $CD4^+$- и $CD8^+$-лимфоциты присутствуют у большинства выздоравливающих независимо от тяжести перенесенного заболевания и эти популяции сохраняются в течение 6–8 месяцев после заражения [29].

У подавляющего числа перенесших COVID-19 средней степени тяжести были обнаружены антигенспецифические Т-клетки памяти, а после тяжелой формы — у всех переболевших [8], но их количество снижалось в течение шести месяцев [4].

A. Mazzoni с соавт. [22] показали, что у лиц, имеющих в анамнезе COVID-19 в средней и тяжелой форме, регистрируется более напряженный адаптивный клеточный иммунный ответ, по сравнению с пациентами, болевшими бессимптомно. N. Le Bert с соавт. [18] получили результаты, свидетельствующие о том, что у лиц с бессимптомным течением инфекции развивается высокофункциональный клеточный иммунный ответ.

У пациентов с тяжелым и очень тяжелым течением COVID-19 выявлено уменьшение относительного количества IgD^+CD27^+ В-клеток памяти, а у последних — значительное снижение IgD^-CD27^+ В-клеток памяти по сравнению со здоровыми добровольцами. Обнаружено также, что для больных в очень тяжелом состоянии характерен повышенный процент $CD27^+CD38^{hi}$, $CD21^-CD11c^-DN3$ и IgD^-CD27^+ В-клеток памяти, в то время как для пациентов с тяжелым COVID-19 — атипичных $CD27^+$В-клеток с негативной памятью ($CD21^-CD11c^+DN2$), а также активированных наивных В-клеток ($CD11c^+$ $IgD^+CD38^{-/+}$). Отмечено снижение доли наивных (IgD^+CD38^-) и циркулирующих В-клеток в кровотоке при тяжелом заболевании и значительное повышение доли плазмобластов ($CD19^+$ $CD20^-CD38^{high}CD27^{high}$), независимо от степени тяжести инфекции [17].

Недавнее сравнительное исследование между пациентами с тяжелым и легким течением инфекции выявило более высокий уровень гуморального иммунного ответа у пациентов с тяжелой формой COVID-19, обусловленный увеличением клональной экспансии и активации BCR [36]. Обнаружена статистически значимая корреляция между степенью тяжести заболевания и концентрациями IgG (к N-белку, S(RBD)-белку). Показано, что уровни IgG, как в целом, так и по подклассам (и прежде всего IgG3), выше у пациентов с тяжелой клинической картиной [16]. В то же время сыворотки практически всех выздоравливающих, в том числе и детей, переболевших бессимптомно, обладают нейтрализующей активностью [29].

Учитывая вышеизложенное, нами проведена сравнительная оценка наличия и длительности сохранения адаптивного иммунитета у переболевших COVID-19.

Целью исследования явилось изучение формирования и оценка напряженности клеточного и гуморального иммунного ответа у лиц, перенесших COVID-19 разной степени тяжести.

Материалы и методы

Обследовано 63 переболевших новой коронавирусной инфекцией. Средний возраст обследуемых составил 47,3±12,5 года. Волонтеров распределили на три группы по степени тяжести перенесенной инфекции: бессимптомно — 30 человек (9 мужчин, 21 женщина); средней степени тяжести — 21 человек (7 мужчин, 14 женщин); в тяжелой форме — 12 человек (3 мужчины, 9 женщин). Бессимптомное течение заболевания подтверждалось положительным тестом ПЦР. У волонтеров со средней степенью тяжести инфекции, при положительном тесте ПЦР, присутствовали симптомы ОРВИ (повышение температуры до 37–38°С в течение нескольких суток, насморк, боль в горле, общее недомогание) без поражения легких. В группу с тяжелым течением заболевания относили пациентов с положительным тестом ПЦР и, при наличии вышеперечисленных симптомов, поражением легких 30% и более. Группу контроля составили 8 здоровых человек (женщины) (ПЦР-тест отрицательный, специфические

антитела отсутствуют, без признаков ОРВИ) в возрасте 35,5±3,46 лет.

От всех волонтеров было получено добровольное информированное согласие. Дизайн исследования одобрен Комиссией по биомедицинской этике ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 1 от 28.01.2021).

Наблюдение за волонтерами осуществляли в течение десяти месяцев после перенесенной инфекции. Через 3–4, 5–6, 7–8 и 9–10 месяцев после снятия диагноза у волонтеров опытных групп осуществляли забор крови.

О формировании клеточного иммунитета судили по увеличению синтеза IFNγ лимфоцитами периферической крови в ответ на стимуляцию их гликопротеином S(RBD) возбудителя COVID-19.

Для этого у волонтеров натощак в утренние часы осуществляли взятие крови из локтевой вены в пробирку VACUTAINER (BD), содержащую динатриевую соль ЭДТА. К 1 мл цельной крови добавляли 10 мкг гликопротеина S(RBD) SARS-CoV-2 (ООО «Иннова плюс», Россия) и инкубировали при 37°C в атмосфере CO_2 инкубатора в течение 16–20 ч. Затем отделяли плазму центрифугированием при 1000g в течение 10 мин и в ней определяли количество IFNγ, используя тест-систему «Гамма-Интерферон-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», Россия). Регистрировали количество волонтеров, у которых наблюдалось увеличение количества IFNγ не менее чем в два раза, по сравнению со спонтанной продукцией. В качестве положительного контроля для стимуляции исследуемых образцов лимфоцитов использовали поликлональный активатор Т-лимфоцитов фитогемагглютинин (Sigma, США) в дозе 10 мкг на пробу. Учитывали исследования, в которых значения отрицательного и положительного контролей соответствовали референтным значениям спонтанной и индуцированной продукции IFNγ, представленным производителем тест-системы.

О формировании гуморального иммунного ответа судили по наличию (качественная оценка) антител класса G, которые определяли с помощью тест-системы «SARS-CoV-2RBD-ИФА-Гамалеи» (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России) согласно инструкции производителя. Регистрировали процент волонтеров, у которых коэффициент позитивности был равен или превышал 1,1.

Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007). Определяли среднее арифметическое значение ± стандартное квадратичное отклонение, медиану (ME). Качественные признаки выражали в виде относительного числа (%). Проводили сравнение совокупностей по качественным признакам с помощью критерия Фишера. Отличия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Для оценки формирования клеточного иммунитета у волонтеров в разные сроки после выздоровления изучали спонтанную и индуцированную продукцию IFNγ. О наличии клеточного иммунного ответа к возбудителю COVID-19 свидетельствовало увеличение секреции этого цитокина в ответ на стимуляцию S(RBD)-белком SARS-CoV-2. Результаты исследования представлены в табл. 1.

При изучении гуморального иммунного ответа проводили качественную оценку наличия в сыворотке крови антител класса G к S-белку возбудителя новой коронавирусной инфекции. Регистрировали количество волонтеров, у которых коэффициент позитивности был ≥ 1,1 (табл. 2).

Анализ полученных результатов показал, что через три месяца после окончания заболевания наличие клеточного иммунного ответа выявлено у всех категорий волонтеров, участвующих в исследовании (табл. 3)

Наибольший процент волонтеров, у которых сформировался клеточный иммунитет, был определен нами в группе тяжелопереболевших ($p < 0,05$). Статистически достоверных отличий в процентном соотношении по этому показателю в пределах двух остальных обследуемых групп зарегистрировано не было ($p > 0,05$).

Через пять месяцев после выздоровления в группе болевших тяжело наблюдалось достоверное ($p < 0,05$) по отношению к другим группам снижение количества волонтеров, имеющих клеточный иммунитет к SARS-CoV-2. Его наличие регистрировалось только у 50% принимавших участие в исследовании. Такая же тенденция сохранялась и на седьмой месяц после COVID-19. Через 9–10 месяцев клеточный иммунитет сохранялись только у 16,7% перенесших болезнь в тяжелой форме.

В группе переболевших COVID-19 в средней степени тяжести через полгода также наблюдалось постепенное уменьшение количества волонтеров, у которых сохранялись специфические к SARS-CoV-2 Т-клетки. К концу срока наблюдения число этих лиц сократилось практически в два раза.

Аналогичная тенденция регистрировалась и у перенесших COVID-19 бессимптомно.

Следует отметить, что процент волонтеров с клеточным иммунитетом к возбудителю COVID-19 в группах переболевших бессимптомно и в средней степени тяжести был практически одинаковым с третьего по восьмой месяц

Таблица 1. Продукция IFNγ (пг/мл) у волонтеров, перенесших COVID-19, в разные сроки после окончания заболевания

Table 1. IFNγ production (pg/ml) in COVID-19 convalescent patients at different time points after the end of the disease

Форма перенесенного заболевания Severity of intection	**3–4 месяца** 3–4 months			**5–6 месяцев** 5–6 months			**7–8 месяцев** 7–8 months			**9–10 месяцев** 9–10 months		
	Спонтанная Spontaneous	**ФГА** FHA	**RBD**	**Спонтанная** Spontaneous	**ФГА** FHA	**RBD**	**Спонтанная** Spontaneous	**ФГА** FHA	**RBD**	**Спонтанная** Spontaneous	**ФГА** FHA	**RBD**
Тяжелая Severe (n = 12)	10,4±1,1 ME 9,5 (7–15)	396±23,6 ME 392,5 (225–510)	231±62,8 ME 76,6 (51–510) (n = 9)	10,3±4,0 ME 12 (4–12)	414±36,3 ME 425 (225–595)	119,4±28,3 ME 112 (53–210) (n = 6)	11,7±2,5 ME 12 (8–15)	415±31,1 ME 380 (295–555)	121,6±31,1 ME 112 (50–510) (n = 6)	11,0±2,6 ME 10 (8–15)	400±29,7 ME 392,5 (220–540)	231±62,8 ME 76,6 (115–125) (n = 2)
			15,7±2,0 ME 15 (8–25) (n = 3)			12,4±2,7 ME 10 (4–20) (n = 6)			9,4±2,2 ME 10 (5–16) (n = 6)			13±1,7 ME 10 (6–25) (n = 10)
Средняя Medium (n = 21)	9,8±1,7 ME 9,0 (4–16)	401±28,5 ME 392,5 (235–545)	206±26,7 ME 195 (55–495) (n = 15)	9,6±1,4 ME 9 (6–16)	389±28,7 ME 392 (250–590)	154±31,8 ME 110 (55–455) (n = 14)	10,7±1,0 ME 10 (6–15)	467±35,1 ME 472 (265–690)	164,2±27,9 ME 140 (75–455) (n = 13)	10,8±1,0 ME 12 (6–14)	451±31,2 ME 457 (295–595)	281±72,8 ME 207,5 (55–485) (n = 8)
			12,6±3,4 ME 11 (6–25) (n = 6)			15,7±2,5 ME 15 (8–25) (n = 7)			16±1,8 ME 17,5 (10–20) (n = 8)			13±2,2 ME 12 (4–30) (n = 13)
Бессимптомная Asymptomatic (n = 30)	9,8±1,1 ME 10 (6–14)	486±21,1 ME 495 (345–575)	168±29,1 ME 110 (55–455) (n = 22)	11,8±1,4 ME 12 (6–16)	465±30,4 ME 490 (225–570)	160,5±19,3 ME 142 (50–435) (n = 20)	10,6±1,3 ME 10 (5–16)	483±26,9 ME 477,5 (325–590)	204,6±30,1 ME 180 (85–490) (n = 19)	10,8±1,2 ME 10 (6–15)	492±20,5 ME 492,5 (355–585)	156,5±15,8 ME 165 (55–310) (n = 17)
			11,5±2,4 ME 11 (5–25) (n = 8)			13,1±1,7 ME 13 (6–20) (n = 10)			12,9±2,4 ME 10 (4–20) (n = 11)			13,1±2,1 ME 10 (4–25) (n = 13)

наблюдения, статистически достоверных отличий между этими двумя группами выявлено не было ($p > 0,05$). Только через девять месяцев после заболевания в группе перенесших инфекцию средней степени тяжести количество обследованных, имеющих клеточный иммунитет, было достоверно снижено по сравнению с группой болевших бессимптомно, но оставалось выше, чем в группе болевших тяжело.

При оценке формирования гуморального иммунитета к SARS-CoV-2 получены результаты, свидетельствующие о том, что у всех волонтеров из группы перенесших инфекцию в тяжелой форме сформировались антитела к S-белку SARS-CoV-2 (см. табл. 3). Эти показатели сохранялись до 7–8 месяцев после выздоровления. Только через 9–10 месяцев количество лиц с гуморальным иммунитетом к COVID-19 снизилось

У волонтеров, переболевших бессимптомно и в средней степени тяжести, также формировался гуморальный иммунный ответ. Количество человек, имеющих IgG, было примерно одинаковым в этих двух группах ($p > 0,05$), но достоверно ниже, чем в группе болевших в тяжелой форме ($p < 0,05$).

Уже через 7 месяцев после выздоровления в группе перенесших среднюю форму COVID-19 наблюдалась достоверное ($p < 0,05$), по сравнению с другими группами, уменьшение числа волонтеров, в сыворотке которых определялись антитела к S-белку, которое продолжилось и в дальнейшем.

Результаты, полученные при серологическом обследовании переболевших бессимптомно, свидетельствуют о том, что только через 9 месяцев в этой группе наблюдалось снижение числа волонтеров с гуморальным иммунным ответом к SARS-CoV-2. Следует отметить, что их количество оставалось статистически выше ($p < 0,05$), чем в группе перенесших новую коронавирусную инфекцию средней степени тяжести, но ниже, чем в группе болевших тяжело.

При оценке распределения волонтеров в рамках каждой группы по признаку наличия или отсутствия клеточного и гуморального иммунитета к возбудителю COVID-19 выявлено, что среди тяжелопереболевших во все сроки исследования отсутствовали волонтеры, у которых сформировался только клеточный иммунный ответ (см. табл. 3). Через полгода доля обследованных с клеточным и гуморальным иммунитетом снизилась, а количество волонтеров с IgG к S-белку SARS-CoV-2 увеличилось, превышая таковое в группе болевших в средней форме и бессимптомно. Такая же тенденция сохранялась до конца срока наблюдения. Следует отметить, что через 9–10 месяцев у 16,6% выздоровевших отсутствовал как клеточный иммунитет, так и IgG к S-белку SARS-CoV-2.

В группе перенесших заболевание средней степени тяжести у одного волонтера выработался только клеточный иммунитет, а у двух — клеточное и гуморальное звено не активировалось (см. табл. 3). Через 7–8 месяцев после выздо-

Таблица 2. Наличие антител класса G у перенесших COVID-19 в разные сроки после окончания заболевания

Table 2. Detected SARS-CoV-2-specific class G antibodies in COVID-19 convalescent patients at different time points after the end of the disease

Форма перенесенного заболевания Severity of infection	**Коэффициент позитивности** The coefficient of positivity	**3–4 месяца** 3–4 months	**5–6 месяцев** 5–6 months	**7–8 месяцев** 7–8 months	**9–10 месяцев** 9–10 months
Тяжелая Severe **(n = 12)**	≥ 1,1	9,74±1,4 ME 9,9 (3,3–16) (n = 12)	7,4±1,5 ME 6,9 (1,3–16) (n = 12)	6,0±1,3 ME 4,8 (1,3–11,3) (n = 12)	5,2±1,2 ME 3,6 (1,3–11,2) (n = 10)
	< 1,1	–	–	–	0,7±0,2 ME 0,7 (0,56–0,89) (n = 2)
Средняя Medium **(n = 21)**	≥ 1,1	8,4±1,5 ME 6,4 (1,2–16) (n = 18)	6,44±0,9 ME 5,9 (1,3–11,9) (n = 17)	4,8±1,2 ME 4,4 (1,2–9,6) (n = 14)	3,8±0,9 ME 2,7 (1,1–11,7) (n = 11)
	< 1,1	0,7±0,1 ME 0,7 (0,34–0,98) (n = 3)	0,61±0,09 ME 0,57 (0,34–0,93) (n = 4)	0,63±0,07 ME 0,6 (0,3–1,0) (n = 7)	0,64±0,09 ME 0,57 (0,35–0,97) (n = 10)
Бессимптомная Asymptomatic **(n = 30)**	≥ 1,1	6,0±0,96 ME 4,4 (1,3–16) (n = 26)	6,3±0,8 ME 5,3 (1,3–11,9) (n = 24)	5,9±0,9 ME 4,5 (1,6–11,8) (n = 24)	5,45±0,95 ME 3,8 (1,9–11,9) (n = 21)
	< 1,1	0,6±0,06 ME 0,6 (0,45–0,7) (n = 4)	0,68±0,09 ME 0,63 (0,45–1,0) (n = 6)	0,66±0,1 ME 0,6 (0,35–0,98) (n = 6)	0,64±0,08 ME 0,6 (0,3–0,97) (n = 9)

ровления доля обследованных с гуморальным и клеточным иммунитетом достоверно снизилась за счет увеличения числа волонтеров, имеющих только клеточный иммунный ответ к возбудителю COVID-19. Следует отметить, что этот показатель превышал таковой у переболевших бессимптомно. В конце исследования количество лиц, у которых сохранился клеточный и гуморальный иммунитет к SARS-CoV-2, уменьшилось в семь раз по сравнению с началом исследования и стало достоверно ниже, чем в группе болевших бессимптомно. Число обследованных, имеющих антитела к возбудителю новой коронавирусной инфекции, напротив увеличилось, хотя оставалось статистически ниже, чем в группе тяжелопереболевших.

У болевших бессимптомно к концу срока наблюдения регистрировалось снижение числа волонтеров, у которых активировались оба звена иммунитета, но статистически этот показатель превышал таковой в группах переболевших в средней и тяжелой форме. Следует отметить, что число лиц с гуморальным иммунным ответом через полгода и до конца исследования оставалось в этой группе достоверно ниже, чем в группе болевших тяжело.

Обсуждение

До сих пор нет четкого мнения, почему у одних COVID-19 протекает бессимптомно, а у других вызывает тяжелое поражение легких и приводит к смертельному исходу. Несомненно, важную роль играет антигенная нагрузка, влияющая на величину и продолжительность иммунных реакций, а также значительная гетерогенность индивидуумов в иммунных реакциях на SARS-CoV-2, определяющая степень иммунной защиты от новой коронавирусной инфекции [29]. Известно, что для полной оценки адаптивного иммунного ответа к SARS-CoV-2, необходимо, наряду с определением уровня антител, выявлять наличие Т-клеточного иммунитета, так как он может активироваться раньше гуморального звена [1]. Кроме того, описаны случаи формирования антигенспецифических лимфоцитов без сероконверсии [10]. Наличие антигенспецифических Т-клеток также может иметь решающее значение в случае, когда одних антител недостаточно для эффективной защиты [29]. Доказано, что как гуморальный, так и клеточный адаптивный иммунитет способствует элиминации SARS-CoV-2 и обеспечивает защиту от повторной инфекции [35]. Выявлена четкая корреляция между клиническим исходом и адекватным адаптивным иммунным ответом, обеспечивающимся $CD4^+$-, $CD8^+$-лимфоцитами и иммуноглобулинами. Специфические SARS-CoV-2 Т- и В-лимфоциты

Таблица 3. Распределение волонтеров, имеющих клеточный и гуморальный иммунитет к возбудителю COVID-19 в разные сроки после выздоровления
Table 3. Distribution of volunteers with SARS-CoV-2 cellular and humoral immunity at different time points after recovery

Форма перенесенного заболевания Severity of infection	Волонтеры (%), имеющие: Volunteers (%) with:		Сроки исследования/Time points					
			3–4 месяца/3–4 months	5–6 месяцев/5–6 months	7–8 месяцев/7–8 months	9–10 месяцев/9–10 months		
			Гуморальный иммунитет к SARS-CoV-2/Humoral immunity to SARS-CoV-2					
			Есть/Yes	Нет/No	Есть/Yes	Нет/No	Есть/Yes	Нет/No
Тяжелая Severe **(n = 12)**	**Клеточный иммунитет к SARS-CoV-2** Cellular immunity to SARS-CoV-2	**Есть** Yes	75 (n = 9)	–	50*** (n = 6)	–	50 (n = 6)	–	16,7*** (n = 2)	–
		Нет No	25 (n = 3)	–	50*** (n = 6)	–	50 (n = 6)	–	66,6*** n = 8)	16,6 (n = 2)
Средняя Medium **(n = 21)**		**Есть** Yes	66,6 (n = 14)	4,8 (n = 1)	57,1 (n = 12)	9,5 (n = 2)	38,1*** (n = 8)	23,8**, *** (n = 5)	9,5**, ** (n = 2)	28,6 (n = 6)
		Нет No	19 (n = 4)	9,5 (n = 2)	23,8* (n = 5)	9,5 (n = 2)	28,6* (n = 6)	9,5 (n = 2)	42,8*, *** (n = 9)	19 (n = 4)
Бессимптомная Asymptomatic **(n = 30)**		**Есть** Yes	66,6 (n = 20)	6,3 (n = 2)	53,3 (n = 16)	12,5 (n = 4)	53,3 (n = 16)	9,4 (n = 3)	36,6*, *** (n = 11)	18,8*** (n = 6)
		Нет No	20,0 (n = 6)	6,3 (n = 2)	26,7* (n = 8)	6,3 (n = 2)	26,7* (n = 8)	9,4 (n = 3)	33,3* (n = 10)	9,4 (n = 3)

Примечание. * — достоверное отличие от показателя в эти сроки в группе тяжелопереболевших ($p < 0,05$); ** — достоверное отличие от показателя в эти сроки в группе болевших бессимптомно ($p < 0,05$); *** — достоверное отличие показателя от более ранних сроков в рамках одной группы ($p < 0,05$).

Note. * — a significant difference compared to seriously ill subjects ($p < 0,05$); ** — a significant difference compared to asymptomatic patients ($p < 0,05$); *** — a significant in-group difference compared to earlier time points ($p < 0,05$).

памяти и антитела реализуют адаптивную иммунную память в течение восьми месяцев после первичной инфекции [13]. Т-лимфоциты памяти поддерживают антивирусный иммунитет к SARS-CoV-2 и способствуют защите от повторного инфицирования [31].

Проведенная сравнительная оценка наличия и длительности сохранения адаптивного иммунитета у перенесших COVID-19 разной степени тяжести, свидетельствует о том, что у переболевших из всех групп формируется как гуморальный, так и клеточный иммунитет к возбудителю новой коронавирусной инфекции. Однако количество лиц с адаптивным иммунитетом к COVID-19 и длительность его сохранения зависит от тяжести перенесенной инфекции. Значительное снижение числа обследованных, имеющих клеточный иммунитет, выявлено в группе тяжелопереболевших, что, по литературным данным, может быть связано с тем, что у таких пациентов возбудитель COVID-19 вызывает как лимфоцитопению, так и функциональное истощение иммунокомпетентных клеток [7, 19, 21]. В то же время у большинства волонтеров этой группы регистрировалось наличие иммуноглобулинов класса G до конца срока наблюдения, что согласуется с результатами, полученными другими исследователями [16]. В рамках этой группы, в отличие от двух других, не были выявлены лица, у которых сформировался только клеточный иммунитет, а волонтеры, у которых не осталось адаптивного иммунитета к возбудителю новой коронавирусной инфекции появились только к концу эксперимента.

К окончанию исследования сохранялся высокий процент волонтеров с клеточным и гуморальным ответом к SARS-CoV-2 в группе перенесших инфекцию бессимптомно. Причем доля имеющих только клеточный иммунитет в эти сроки достоверно увеличивалась. Возможно, заражение небольшим количеством возбудителя адекватно запускает формирование адаптивного иммунитета, не оказывая негативного воздействия на иммунокомпетентные клетки хозяина. Полученные другими авторами результаты свидетельствуют о том, что пациенты без клинических симптомов могут вырабатывать устойчивый иммунитет против SARS-CoV-2 [9, 14, 15]. У пациентов с бессимптомным течением наблюдалось меньше провоспалительных и больше защитных иммунных реакций против SARS-CoV-2: наличие антигенспецифических Т-хелперов (Th) 2 типа и Th17, нейтрализующих антител, а также более высокие уровни факторов роста, которые связаны с восстановлением клеток [6].

Среди перенесших COVID-19 средней степени тяжести уменьшение числа волонтеров, у которых регистрировался и клеточный, и гуморальный иммунный ответ, началось раньше, чем в группе переболевших бессимптомно. Увеличивалась доля лиц с клеточным иммунитетом, а в более поздние сроки — с гуморальным иммунным ответом.

Таким образом, полученные нами результаты способствуют пониманию механизмов формирования адаптивного иммунного ответа к SARS-CoV-2 и длительности его сохранения у пациентов, перенесших COVID-19 разной степени тяжести. Согласно полученным данным, в конце срока наблюдения число волонтеров, имеющих гуморальный иммунитет к возбудителю новой коронавирусной инфекции, выше, по сравнению с теми, у кого регистрируется клеточный иммунный ответ.

Появление новых мутантных вариантов SARS-CoV-2, наряду с непрерывным мониторингом их распространения, проведением оценки клинических проявлений [20], диктует необходимость продолжения исследований в этом направлении, так как вопрос об эффективности приобретенного раннее постинфекционного или поствакцинального иммунитета против новых мутантных штаммов SARS-CoV-2 остается открытым.

Список литературы/References

1. Потеряев Д.А., Аббасова С.Г., Игнатьева П.Е., Стрижакова О.М., Колесник С.В., Хамитов Р.А. Оценка Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 у переболевших и вакцинированных против COVID-19 лиц с помощью ELISPOT набора ТиграТест® SARS-CoV-2 // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2021. Т. 21, № 3. С. 178–192. [Poteryaev D.A., Abbasova S.G., Ignatieva P.E., Strizhakova O.M., Kolesnik S.V., Khamitov R.A. Assessment of T-cell immunity to SARS-CoV-2 in persons who have been ill and vaccinated against COVID-19 using ELISPOT kit TigraTest® SARS-CoV-2. BIOpreparaty. *Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment, 2021, vol. 21, no. 3, pp. 178–192. (In Russ.)*] *doi: 10.30895/2221-996X-2021-21-3-178-192*
2. Achiron A., Gurevich M., Falb R., Dreyer-Alster S., Sonis P., Mandel M. SARS-CoV-2 antibody dynamics and B-cell memory response over time in COVID-19 convalescent subjects. *Clin. Microbiol. Infect., 2021, vol. 27, no. 9, pp. 1349.e1–1349.e6. doi: 10.1016/j.cmi.2021.05.008*
3. Ahluwalia P., Vaibhav K., Ahluwalia M., Mondal A.K., Sahajpal N., Rojiani A.M., Kolhe R. Infection and immune memory: variables in robust protection by vaccines against SARS-CoV-2. *Front. Immunol., 2021, no. 12: 660019. doi: 10.3389/fimmu.2021.660019*
4. Breton G., Mendoza P., Hagglof T., Oliveira T.Y., Schaefer-Babajew D., Gaebler C., Turroja M., Hurley A., Caskey M., Nussenzweig M.C. Persistent cellular immunity to SARS-CoV-2 infection. *J. Exp. Med., 2021, vol. 218, no. 4: e20202515. doi: 10.1084/jem.20202515*

5. Cassaniti I., Percivalle E., Bergami F., Piralla A., Comolli G., Bruno R., Vecchia M., Sambo M., Colaneri M., Zuccaro V., Benazzo M., Robotti C., Calastri A., Maiorano E., Ferrari A., Cambiè G., Baldanti F. SARS-CoV-2 specific T-cell immunity in COVID-19 convalescent patients and unexposed controls measured by ex vivo ELISpot assay. *Clin. Microbiol. Infect., 2021, vol. 27, no. 7, pp. 1029–1034. doi: 10.1016/j.cmi.2021.03.010*
6. Chan Y.-H., Fong S.-W., Poh C.-M., Carissimo G., Yeo N.K.-W., Amrun S.N., Goh Y.S., Lim J., Xu W., Chee R.S.-L., Torres-Ruesta A., Lee C.Y-P., Tay M.Z., Chang Z.W., Lee W.-H., Wang B., Tan S.-Y., Kalimuddin S., Young B.E., Leo Y.-S., Wang C.-I., Lee B., Rötzschke O., Lye D.C., Renia L., Ng L.F. A symptomatic COVID-19: disease tolerance with efficient anti-viral immunity against SARS-CoV-2. *EMBO Mol. Med., 2021, no. 13: e14045. doi: 10.15252/emmm.202114045*
7. Chen Z., Wherry E.J. T cell responses in patients with COVID-19. *Nat. Rev. Immunol., 2020, no. 206, pp. 529–536. doi: 10.1038/s41577-020-0402-6*
8. De Angelis M.L., Francescangeli F., Rossi R., Giuliani A., De Maria R., Zeuner A. Repeated exposure to subinfectious doses of SARS-CoV-2 may promote t cell immunity and protection against severe COVID-19. *Viruses, 2021, no. 13: 961. doi: 10.3390/v13060961*
9. Dwyer C.J., Cloud C.A., Wang C., Heidt P., Chakraborty P., Duke T.F., McGue S., Jeffcoat B., Dunne J., Johnson L., Choi S., Nahhas G.J., Gandy A.S., Babic N., Nolte F.S., Howe P., Ogretmen B., Gangaraju V.K., Tomlinson S., Madden B., Bridges T., Flume P.A., Wrangle J., Rubinstein M.P., Baliga P.K., Nadig S.N., Mehrotra S. Comparative analysis of antibodies to SARS-CoV-2 between asymptomatic and convalescent patients. *iScience, 2021, vol. 24, no. 6: 102489. doi: 10.1016/j.isci.2021.102489*
10. Gallais F., Velay A., Nazon C., Wendling M-J, Partisani M., Sibilia J., Intrafamilial exposure to SARS-CoV-2 associated with cellular immune response without seroconversion, France. *Emerg. Infect. Diseases, 2021, vol. 27, no. 1, pp. 113–121. doi: 10.3201/eid2701.203611*
11. Gallais F., Velay A., Wendling M.-J., Nazon C., Partisani M., Sibilia J., Candon S., Fafi-Kremer S. Intrafamilial exposure to SARS-CoV-2 induces cellular immune response without seroconversion. *medRxiv, 2020.06.21.2013244, Preprint, 2020. doi: 10.1101/2020.06.21.20132449*
12. Gerhards C., Thiaucourt M., Kittel M., Becker C., Ast V., Hetjens M., Neumaier M., Haselmann V. Longitudinal assessment of anti-SARS-CoV-2 antibody dynamics and clinical features following convalescence from a COVID-19 infectionnt. *J. Infect. Dis., 2021, no. 107, pp. 221–227. doi: 10.1016/j.ijid.2021.04.080*
13. Israelow B., Mao T., Klein J., Song E., Menasche B., Omer S.B., Iwasaki A. Adaptive immune determinants of viral clearance and protection in mouse models of SARS-CoV-2. *Sci. Immunol., 2021, vol. 6, no. 64: eabl4509. doi: 10.1126/sciimmunol.abl4509*
14. Jagannathan P., Wang T.T. Immunity after SARS-CoV-2 infections. *Nat. Immunol., 2021, vol. 22, no. 5, pp. 539–540. doi: 10.1038/s41590-021-00923-3*
15. Kedl R.M.J. Down but far from out: the durability of SARS-CoV-2 immunity after asymptomatic infection. *Exp. Med., 2021, vol. 218, no. 5: e20210359. doi: 10.1084/jem.20210359*
16. Korobova Z.R., Zueva E.V., Arsentieva N.A., Batsunov O.K., Liubimova N.E., Khamitova I.V., Kuznetsova R.N., Rubinstein A.A., Savin T.V., Stanevich O.V., Kulikov A.N., Pevtsov D.E., Totolian A.A. Changes in anti-SARS-CoV-2 IgG subclasses over time and in association with disease severity. *Viruses, 2022, no. 14: 941. doi: 10.3390/v14050941*
17. Kudryavtsev I.V., Arsentieva N.A., Batsunov O.K., Korobova Z.R., Khamitova I.V., Isakov D.V., Kuznetsova R.N., Rubinstein A.A., Stanevich O.V., Lebedeva A.A., Vorobyov E.A., Vorobyova S.V., Kulikov A.N., Sharapova M.A., Pevtcov D.E., Totolian A.A. Alterations in B cell and follicular T-helper cell subsets in patients with acute COVID-19 and COVID-19 convalescents. *Curr. Iss. Mol. Biol., 2022, no. 44, pp. 194–205. doi: 10.3390/cimb4401001*
18. Le Bert N., Clapham H.E., Tan A.T., Chia W.N., Tham C.Y.L., Lim J.M., Kunasegaran K., Tan L.W.L., Dutertre C.-A., Shankar N., Lim J.M.E., Sun L.J., Zahari M., Tun Z.M., Kumar V., Lim B.L., Lim S.H., Chia A., Tan Y.-J., Tambyah P.A., KalimuddinS., Lye D., Low J.G.H., Wang L.-F., Wan W.Y., Hsu L.Y., Bertoletti A., Tam C.C. Highly functional virus-specific cellular immune response in asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *J. Exp. Med., 2021, vol. 218, no. 5: e20202617. doi: 10.1084/jem.20202617*
19. Lin L., Lu L., Cao W., Li T. Hypothesis for potential pathogenesis of SARS-CoV-2 infection-a review of immune changes in patients with viral pneumonia. *Emerg. Microbes Infect., 2020, vol. 9, no. 1, pp. 727–732. doi: 10.1080/22221751.2020.1746199*
20. Lippi G., Henry B.M. How will emerging SARS-CoV-2 variants impact herd immunity? *Ann. Transl. Med., 2021, vol. 9, no. 7: 585. doi: 10.21037/atm-21-893*
21. Liu J., Li S., Liu J., Liang B., Wang X., Wang H., Li W., Tong Q., Yi J., Zhao L., Xiong L., Guo C., Tian J., Luo J., Yao J., Pang R., Shen H., Peng C., Liu T., Zhang Q., Wu J., Xu L., Lu S., Wang B., Weng Z., Han C., Zhu H., Zhou R., Zhou H., Chen X., Ye P., Zhu B., Wang L., Zhou W., He S., He Y., Jie S., Wei P., Zhang J., Lu Y., Wang W., Zhang L., Li L., Zhou F., Wang J., Dittmer U., Lu M., Hu Y., Yang D., Zheng X. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. *EBioMedicine, 2020, no. 55: 102763. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102763*
22. Mazzoni A., Maggi L., Capone M., Vanni A., Spinicci M., Salvati L., Kiros S.T., Semeraro R., Pengue L., Colao M.G., Magi A., Rossolini G.M., Liotta F., Cosmi L., Bartoloni A., Annunziato F. Heterogeneous magnitude of immunological memory to SARS-CoV-2 in recovered individuals. *Clin. Transl. Immunol., 2021, vol. 10, no. 5: e1281. doi: 10.1002/cti2.1281*
23. Ni L., Ye F., Cheng M.-L., Feng Y., Deng Y.-Q., Zhao H., Wei P., Ge J., Gou M., Li X., Sun L., Cao T., Wang P., Zhou C., Zhang R., Liang P., Guo H., Wang X., Qin C.-F., Chen F., Dong C. Detection of SARS-CoV-2-specific humoral and cellular immunity in COVID-19 convalescent. *Individuals Immunity, 2020, vol. 52, no. 6, pp. 971–977. doi: 10.1016/J.IMMUNI.2020.04.023*
24. Oja A.E., Saris A., Ghandour C.A., Kragten N.A.M., Hogema B.M., Nossent L.M., Heunks A., Cuvalay S., Slot E., Swaneveld F.H., Vrielink H., Rispens T., van der Schoot E.J.E., van Lier R.A.W., Ten Brinke A., Hombrink P. Divergent SARS-CoV-2-specific T and B cell responses in severe but not mild COVID-19. *bioRxiv, 2020.06.18.159202, Preprint, 2020. doi: 10.1101/2020.06.18.159202*
25. Qin C., Zhou L., Hu Z., Zhang S., Yang S., Tao Y. Xie C., Ma K., Shang K., Wang W., Tian D.S. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clin. Infect. Dis., 2020, no. 71, pp. 762–768. doi: 10.1093/cid/ciaa248*
26. Rockstroh A., Wolf J., Fertey J., Kalbitz S., Schroth S., Lübbert C., Ulbert S., Borte S. Correlation of humoral immune responses to different SARS-CoV-2 antigens with virus neutralizing antibodies and symptomatic severity in a German COVID-19 cohort. *Emerg. Microbes Infect., 2021, vol. 10, no. 1, pp. 774–781. doi: 10.1080/22221751.2021.1913973*

27. Sekine T., Perez-Potti A., Rivera-Ballesteros O., Strålin K., Gorin J.B., Olsson A., Llewellyn-Lacey S., Kamal H., Bogdanovic G., Muschiol S., Wullimann D.J., Kammann T., Emgård J., Parrot T., Folkesson E.; Karolinska COVID-19 Study Group; Rooyackers O., Eriksson L.I., Henter J.I., Sönnerborg A., Allander T., Albert J., Nielsen M., Klingström J., Gredmark-Russ S., Björkström N.K., Sandberg J.K., Price D.A., Ljunggren H.G., Aleman S., Buggert M. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. *Cell, 2020, vol. 183, no. 1, pp. 158–168.e14. doi: 10.1016/j.cell.2020.08.017*
28. Shah V.K., Firmal P., Alam A., Ganguly D., Chattopadhyay S. Overview of immune response during SARS-CoV-2 infection: lessons from the past. *Front. Immunol., 2020, no. 11: 1949. doi: 10.3389/FIMMU.2020.01949*
29. Siggins M.K., Thwaites R.S., Openshaw P.J.M. Durability of immunity to SARS-CoV-2 and other respiratory viruses trends. *Microbiol., 2021, vol. 29, no. 7, pp. 648–662. doi: 10.1016/j.tim.2021.03.016*
30. Tan A.T., Linster M., Tan C.W., Bert N.L., Chia W.N., Kunasegaran K., Zhuang Y., Tham C.Y.L., Chia A., Smith G.J.D., Young B., Kalimuddin S., Low J.G.H., Lye D., Wang L.-F., Bertoletti A. Early induction of functional SARS-CoV-2-specific T cells associates with rapid viral clearance and mild disease in COVID-19 patients. *Cell Rep., 2021, vol. 34, no. 6: 108728 doi: 10.1016/j.celrep.2021.108728*
31. Tavukcuoglu E., Horzum U., Cagkan Inkaya A., Unal S., Esendagli G., Functional responsiveness of memory T cells from COVID-19 patients. *Cell Immunol., 2021, no. 365: 104363. doi: 10.1016/j.cellimm.2021.104363*
32. Thieme C.J., Anft M., Paniskaki K., Blazquez-Navarro A., Doevelaar A., Seibert F., Hoelzer B., Konik M.J., Brenner T., Tempfer C., Watzl C., Dolff S., Dittmer U., Westhoff T.H., Witzke O., Stervbo U., Roch T., Babel N. The SARS-CoV-2 T-cell immunity is directed against the spike, membrane, and nucleocapsid protein and associated with COVID-19 severity. *medRxiv, 2020.05.13.20100636, Preprint, 2020. doi: 10.1101/2020.05.13.20100636*
33. Turner J.S., Kim W., Kalaidina E., Goss C.W., Rauseo A.M., Schmitz A.J., Hansen L., Haile A., Klebert M.K., Pusic I., O'Halloran J.A., Presti R.M., Ellebedy A.H. SARS-CoV-2 infection induces long-lived bone marrow plasma cells in humans. *Nature, 2021, no. 595, pp. 421–425. doi: 10.1038/s41586-021-03647-4*
34. Vanshylla K., Di Cristanziano V., Kleipass F., Dewald F., Schommers P., Gieselmann L., Gruell H., Schlotz M., Ercanoglu M.S., Stumpf R., Mayer P., Zehner M., Heger E., Johannis W., Horn C., Suárez I., Jung N., Salomon S., Eberhardt K.A., Gathof B., Fätkenheuer G., Pfeifer N., Eggeling R., Augustin M., Lehmann C., Klein F. Kinetics and correlates of the neutralizing antibody response to SARS-CoV-2 infection in humans. *Cell Host Microbe, 2021, vol. 29, no. 6, pp. 917–929.e4. doi: 10.1016/j.chom.2021.04.015*
35. White H.N. B-cell memory responses to variant viral antigens. *Viruses, 2021, vol. 13, no. 4: 565. doi: 10.3390/v13040565*
36. Zhang F., Gan R., Zhen Z., Hu X., Li X., Zhou F., Liu Y., Chen C., Xie S., Zhang B., Wu X., Huang Z. Adaptive immune responses to SARS-CoV-2 infection in severe versus mild individuals. *Signal Transduct. Target Ther., 2020, vol. 5, no. 1: 156. doi: 10.1038/s41392-020-00263-y*

Авторы:

Иванова И.А., к.б.н., ведущий научный сотрудник, врио зав. лабораторией иммунологии ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Филиппенко А.В., младший научный сотрудник лаборатории иммунологии, ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Труфанова А.А., младший научный сотрудник лаборатории иммунологии ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Омельченко Н.Д., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Чемисова О.С., ио зав. лабораторией «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Водопьянов А.С., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Березняк Е.А., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Соколова Е.П., к.б.н., младший научный сотрудник отдела эпидемиологии ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Носков А.К., директор ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Тотолян А.А., академик РАН, д.м.н., профессор, директор ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Ivanova I.A., PhD (Biology), Leading Researcher, Acting Head of the Immunology Laboratory, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Filippenko A.V., Junior Researcher, Laboratory of Immunology, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Trufanova A.A., Junior Researcher, Laboratory of Immunology, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Omelchenko N.D., PhD (Medicine), Senior Researcher Laboratory of Immunology, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Chemisova O.S., Acting Head of the Laboratory "Collection of Pathogenic Microorganisms" Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Vodopyanov A.S., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Biology of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Bereznyak E.A., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Sokolova E.P., PhD (Biology), Junior Researcher, Epidemiology Department, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Noskov A.K., Director, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Totolian A.A., RAS Full Member, DSc (Medicine), Professor, Director, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 26.12.2022
Принята к печати 12.02.2023

Received 26.12.2022
Accepted 12.02.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 2, pp. 329–337

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 2, с. 329–337

SURVEILLANCE OF ACUTE FLACCID PARALYSIS AND POLIOMYELITIS ON SOME TERRITORIES OF RUSSIA AND SOUTH VIETNAM. PART 1. POLIOVIRUSES AND PARALYSIS

N.I. Romanenkova[a], T.T.T. Nguyen[b], N.R. Rozaeva[a], O.I. Kanaeva[a], V.A. Evseeva[a], M.A. Bichurina[a]

[a] *St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation*
[b] *Pasteur Institute of Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh City, Vietnam*

Abstract. The epidemiological and etiological aspects of poliomyelitis and acute flaccid paralysis (AFP) in Russia and Vietnam were analysed and compared. The polio-free status is maintained on 14 territories of Russia and 29 provinces of South Vietnam. The quality of epidemiological and virological surveillance for acute flaccid paralysis is in accordance with the requirements of the national and international polio surveillance systems. All AFP cases were revealed, registered, reported and investigated in both countries. The percentage of poliovirus isolation from 2492 samples collected from patients with acute flaccid paralysis and contact persons in different years in Russia ranged from 1.3±0.89 to 9.8±0.79. In South Vietnam, 2143 samples from patients with acute flaccid paralysis were investigated. In Russia and Vietnam, we isolated vaccine polioviruses of all three types with predominance of type 3 polioviruses (63% and 50%, respectively) in both countries. From AFP patients in Russia and Vietnam, polioviruses were isolated in 4.9% and 1.0% studied samples, respectively. Some VDPV strains were revealed on the territories of Russia and South Vietnam. Here, we describe five cases of vaccine-associated paralytic poliomyelitis registered in Russia and two cases of AFP caused by VDPV type 2 reported in Vietnam. To prevent the risk of developing vaccine-associated paralytic poliomyelitis, it is indispensable to ensure high-quality surveillance for acute flaccid paralysis, maintain 95% polio vaccine pediatric coverage and strictly comply with sanitary legislation, including the National Vaccination Schedule when vaccinating children, to improve virological surveillance of polioviruses using classical and new virological and molecular methods and to continue research on poliomyelitis, including development of new safe and effective poliovirus vaccines able to induce both humoral and mucosal immunity. The systematic control of adequate polio vaccination is indispensable in order to prevent transmission of imported wild polioviruses into polio free countries as well as circulation of vaccine-derived polioviruses worldwide.

Key words: *acute flaccid paralysis, vaccine-associated paralytic poliomyelitis, polioviruses, circulation, surveillance, vaccination schedule, poliovirus vaccines.*

Адрес для переписки:
Романенкова Наталья Ивановна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 (812) 644-63-47.
Факс: 8 (812) 644-63-10.
E-mail: romanenkova@pasteurorg.ru

Contacts:
Natalya I. Romanenkova
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 644-63-47.
Fax: +7 (812) 644-63-10.
E-mail: romanenkova@pasteurorg.ru

Для цитирования:
Романенкова Н.И., Нгуен Т.Т.Т., Розаева Н.Р., Канаева О.И., Евсеева В.А., Бичурина М.А. Надзор за острым вялым параличом и полиомиелитом на некоторых территориях России и Южного Вьетнама. Часть 1. Полиовирусы и паралич // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 2. С. 329–337. doi: 10.15789/2220-7619-SOA-3403

Citation:
Romanenkova N.I., Nguyen T.T.T., Rozaeva N.R., Kanaeva O.I., Evseeva V.A., Bichurina M.A. Surveillance of acute flaccid paralysis and poliomyelitis on some territories of Russia and South Vietnam. Part 1. Polioviruses and paralysis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 2, pp. 329–337. doi: 10.15789/2220-7619-SOA-3403

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-SOA-3403

НАДЗОР ЗА ОСТРЫМ ВЯЛЫМ ПАРАЛИЧОМ И ПОЛИОМИЕЛИТОМ НА НЕКОТОРЫХ ТЕРРИТОРИЯХ РОССИИ И ЮЖНОГО ВЬЕТНАМА. ЧАСТЬ 1. ПОЛИОВИРУСЫ И ПАРАЛИЧ

Романенкова Н.И.[1], Нгуен Т.Т.Т.[2], Розаева Н.Р.[1], Канаева О.И.[1], Евсеева В.А.[1], Бичурина М.А.[1]

[1] *ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия*

[2] *Интитут Пастера в Хошимине, Хошимин, Вьетнам*

Резюме. Проведен сравнительный анализ эпидемиологического и этиологического аспектов полиомиелита и острых вялых параличей (ОВП) в России и Вьетнаме. Свободный от полиомиелита статус поддерживается на 14 территориях России и в 29 провинциях Южного Вьетнама. Качество эпидемиологического и вирусологического надзора соответствует требованиям национальных и международной систем надзора. Все больные ОВП выявлены, зарегистрированы и обследованы в обеих странах. В России процент выделения полиовирусов из проб от 2492 больных ОВП и контактных лиц в разные годы колебался от 1,3±0,89 до 9,8±0,79. В Южном Вьетнаме было исследовано 2143 пробы от больных с острыми вялыми параличами. В России и Вьетнаме мы выделили полиовирусы всех трех типов с преобладанием полиовирусов типа 3 (63 и 50% соответственно). В России полиовирусы были изолированы из 4,9% проб, во Вьетнаме в 1% проб содержались полиовирусы. Штаммы полиовирусов вакцинного происхождения (VDPV) были обнаружены в России и Вьетнаме. В статье дано описание пяти случаев вакциноассоциированного паралитического полиомиелита в России и двух случаев ОВП, вызванных VDPV типа 2, во Вьетнаме. Для предотвращения риска развития вакциноассоциированного паралитического полиомиелита необходимо обеспечивать высококачественный надзор за ОВП, поддерживать 95% охват детей вакцинацией, строго соблюдать санитарное законодательство и Национальный календарь прививок при иммунизации детей, совершенствовать вирусологический надзор с использованием классических и новых вирусологических и молекулярных методов и продолжать научные исследования по полиомиелиту, в том числе разработку новых безопасных и эффективных полиовирусных вакцин, индуцирующих гуморальный и мукозальный иммунитет. Необходимо контролировать качество вакцинации, чтобы предотвратить импортирование диких и циркуляцию производных от вакцины полиовирусов в свободных от полиомиелита странах и во всем мире.

Ключевые слова: *острый вялый паралич, вакциноассоциированный паралитический полиомиелит, полиовирусы, циркуляция, надзор, календарь вакцинации, полиовирусные вакцины.*

Introduction

Since the General Health Assembly set the ambitious goal of global eradication of poliomyelitis, impressive progress has been made in reducing the incidence of polio [1, 2, 5, 21]. In 1988, 350 000 cases of poliomyelitis were reported in 125 countries; in 2003, there were only 784 cases in 15 countries. But in the same year, wild poliovirus was imported from Nigeria into neighboring African countries, and then the international spread of wild polioviruses from endemic countries to countries free of poliomyelitis was recorded. To date five WHO regions from six are certified as polio free regions [5]. Wild type 1 poliovirus now circulates only in two countries — Afghanistan and Pakistan.

To achieve the goal of eradicating poliomyelitis, WHO has recommended maintaining polio vaccination coverage of children at a level of at least 95%. The effective triple oral poliovirus vaccine (tOPV), inducing both humoral and mucosal immunity in vaccine recipient, served as the main tool for routine and mass immunization [14, 15]. Since 2016, only two-component oral poliovirus vaccine (bOPV) containing virus types 1 and 3 has been used. Vaccine-derived polioviruses — VDPV. can be formed after vaccination of children with tOVP or bOPV during the persistence and replication of polioviruses in the cells of small intestine due to two mechanisms of virus evolution — recombination and mutation [9, 11, 13]. Subsequent circulation of VDPV of different types in the population is possible, which has become another problem of the Polio Eradication Programme.

The main concept of Polio Eradication Programme is the creation of surveillance system based on the data from epidemiological investigations of cases with acute flaccid paralysis (AFP) and on the results of clinical and laboratory diagnostics [1, 2, 21]. Laboratory diagnostics implies a mandatory virological study of two adequate samples of biological material from each patient within the decreed timeframe and in strict accordance with the recommendations of the World Health Organization [1, 20, 21].

In some cases the initial diagnosis is changed to vaccine-associated paralytic poliomyelitis (VAPP) [3, 10]. Based on WHO criteria in such cases the development of paralysis occurs from 4 to 60 days after vaccination with oral polio vaccine in vaccine recipients [19]. The same process occurs in nonvaccinated children as the result of contact with recently vaccinated children. VAPP is characterized by a typical clinical picture of poliomyelitis with an acute onset, rapid development of paralysis, mainly proximal and asymmetric, in the first three days from the onset of the disease, the appearance of atrophy by the 7th day of illness and the presence of residual paralysis after the sixtieth day after onset of paralysis. The diagnosis is made by isolat-

ing polioviruses, either wild, vaccine or vaccine-derived viruses, from the faeces of patients.

The Subnational polio laboratory in Saint Petersburg was created in the scientific laboratory of the Pasteur Institute in St. Petersburg. The laboratory is part of the World Health Organization network of polio laboratories. The laboratory constantly collaborates with virologists and epidemiologists of 14 administrative territories of Russia with the population of 25 million people, including 3 million (12%) children under 15.

The virological laboratory of the Pasteur Institute in Ho Chi Minh City is one of the National polio laboratories in Vietnam and covers 29 provinces of South Vietnam with the population of 45 million people, including 12 million (26,7%) children under 15.

Materials and methods

The analysis was carried out on the basis of information on the primary registration of patients (cards of the epidemiological investigation of cases of acute flaccid paralysis and poliomyelitis, including vaccine-associated) and state statistical reporting data.

During the observation period from 2002 to 2021, 2492 fecal samples were examined from patients with acute flaccid paralysis syndrome and contact persons sent from 14 administrative territories of the Russian Federation. Also, 2143 samples from children with acute flaccid paralysis collected in 29 provinces of South Vietnam were examined.

Isolation of polioviruses was carried out using standard procedures recommended by WHO manual on three cell lines RD, L20B and Hep-2 [20]. Identification of polioviruses was carried out using a neutralization test with specific diagnostic sera on the cell culture on which poliovirus was isolated in accordance with WHO recommendations [17, 20]. Intratypic differentiation (ITD) of polioviruses was performed using ELISA with polyclonal cross-adsorbed sera and PCR with primers specific to vaccine strains of polioviruses [17, 24]. A neutralization reaction was also carried out with monoclonal antibodies to wild and vaccine polioviruses [8]. Molecular studies were performed by partial sequencing of the VP1 region of poliovirus genome [16].

The average errors were determined, and the significance of statistical differences was evaluated using Student's t-test. Differences were considered statistically significant at 95% confidence interval (values of $p < 0.05$).

Results

During the study of 2492 fecal samples from children with acute flaccid paralysis syndrome and people who were in close contact with them from 14 territories of Russia, 60 polioviruses (4.5%) were isolated. According to the results of intratypic differentiation, the majority of polioviruses were vaccine (some polioviruses were classified as VDPV). Identification of polioviruses showed that 15 polioviruses belonged to type 1, seven polioviruses belonged to type 2, and 38 strains belonged to type 3. The percentage of poliovirus isolation fluctuated over the years (Table 1).

In 2002–2007, 58 polioviruses were isolated from patients with AFP (6.2% of cases). In 2008–2009, the percentage of poliovirus isolation decreased to 1.3% that was statistically significant ($p < 0.05$). In 2009, when vaccination of infants with inactivated poliovirus vaccine (IPV) was introduced in the country, not a single poliovirus was isolated [25].

In 2010, when wild type 1 poliovirus was imported into Russia from Tajikistan, 13 vaccine polioviruses were isolated from the AFP cases [22]. In such difficult epidemic situation, the percentage of detection of polioviruses significantly increased to 9.8% ($p < 0.05$). This can be explained by supplementary immunization in order to protect children [1, 3, 9]. It should be noted that in 2010 we also isolated 4 wild type 1 polioviruses in three healthy children who arrived in St. Petersburg from Tajikistan. It is extremely important to state that not a single case of AFP or VAPP caused by wild type 1 poliovirus was record-

Table 1. Isolation of polioviruses and nonpolio enteroviruses from AFP cases and contact persons on 14 territories of Russia

Years	Number of samples	Number of isolated enteroviruses (PV and NPEV)				
		PV (%)	PV1	PV2	PV3	NPEV (%)
2002–2003	378	30 (7.9)	9	11	10	15
2004–2005	256	17 (6.6)	1	7	9	19
2006–2007	300	11 (3.7)	4	6	1	9
2008–2009	232	3 (1.3)	0	1	2	11
2010	133	13 (9.8)	4	4	5	4
2011–2012	230	5 (2.2)	0	1	4	13
2013–2014	216	11 (5.1)	0	0	11	6
2015–2016	245	18 (7.3)	8	2	8	11
2017–2019	325	9 (2.8)	1	0	8	14
2020–2021	178	4 (2.2)	2	0	2	4
Total	2492	121 (4.9)	29	32	60	106 (4.3)

ed in 14 administrative territories of the Russian Federation located in the area of responsibility of the SNL in St. Petersburg.

In 2011–2012, the detection rate of polioviruses in patients with AFP decreased to 2.2% ($p < 0.05$). In 2013, seven patients with AFP living in 5 administrative territories of St. Petersburg RC were found to have type 3 polioviruses. All these children received 4–5 vaccinations against poliomyelitis — 2 doses of inactivated and 2–3 doses of oral vaccine. Acute flaccid paralysis events occurred 4th to 36th days after the last oral polio vaccine vaccination, with different vaccine series. It is important that all nine polioviruses of type 3 were vaccine according to the results of intratypic differentiation. The reason for this situation, most likely, can be associated with the state of the immune system of children. In 2014, only two polioviruses were isolated, both of them belonged to type 3. Most of polioviruses found in samples from patients with AFP in 2014–2015 belonged to type 3, samples from two patients contained mixtures of polioviruses of types 1 and 3, in samples from one patient in 2015 polioviruses of all three types were detected. All polioviruses, according to the results of the ITD, were vaccine viruses. During the next six years from 2016 to 2021, vaccine polioviruses of type 2 were not isolated from patients. This is due to the global switch from a three-component to a two-component oral poliovirus vaccine. During this period, 17 polioviruses (5 type 1 and 12 type 3) were isolated from samples of patients with AFP syndrome, the percentage of poliovirus isolation in 2016–2021 was 2.8% and all polioviruses were vaccine.

It is important to note that during the analyzed period, in some cases, the primary diagnosis "acute flaccid paralysis" was finally changed by the Federal Commission to "vaccine-associated paralytic poliomyelitis" [3, 10, 19].

VAPP can appear after receiving the first dose of oral polio vaccine, usually in recipients with primary or secondary immunodeficiencies. The main reasons for the occurrence of VAPP are the lack of vaccinations in children who should have been vaccinated against polio in accordance with the National Vaccination Schedule. This circumstance contributes to the development of VAPP in unvaccinated children who have been in contact with recently vaccinated children, who can excrete vaccine polioviruses within two months after immunization. In addition, the development of VAPP in vaccinated recipients is possible due to ignoration of the requirements of sanitary legislation by medical personnel during immunization against poliomyelitis in the case when previously unvaccinated children more than 12 months old are vaccinated with an oral vaccine (OPV) instead of an inactivated vaccine (IPV). In Russia in accordance with the National Vaccination Schedule, to protect children against the development of VAPP, an inactivated poliovirus vaccine must be used for the first two vaccinations, regardless of the age of the child.

The following is a description of five cases of acute flaccid paralysis which were classified as vaccine-associated paralytic poliomyelitis.

VAPP case 1: Acute flaccid paralysis was registered on June 14, 2002 in a non-vaccinated girl aged 20 months. It happened during her stay in a noninfectious hospital, that's why she was transferred to hospital for infectious diseases. The girl was immunodeficient (hypogammaglobulinemia). Vaccine type 2 polioviruses were isolated from fecal samples taken from the second to the 78th day from the onset of paralysis. In the blood serum taken on the 2nd day after the detection of paralysis, there were no antibodies to PV1 and PV3, the titer of antibodies to PV2 was 1:16. The antibodies titers to PV2 increased four-fold (1:64) on the 21st day after the onset of paralysis. When examining four children without paralysis who had contact with the sick child in hospital, poliovirus type 2 was also detected, three of them were not vaccinated. On the 60th day from the onset of paralysis, the child had residual paralysis. The final diagnosis was Vaccine-associated Paralytic poliomyelitis in a contact person.

VAPP case 2: Acute flaccid paralysis was registered in a boy on February 7, 2005 at the age of 20 months after receiving the fourth dose of oral polio vaccine. Paralysis developed on the 60th day after revaccination. Vaccine poliovirus type 2 was isolated from fecal samples taken on days 1, 2, 30, 45 from the onset of paralysis. Poliovirus excretion continued for 4 months after vaccination. In blood sera taken on the first and 30 days from the onset of paralysis, there were no antibodies to poliovirus types 1, 2 and 3. The immunological study show the Bruton's disease (agammaglobulinemia). On the 60th day of the onset of paralysis, residual paralysis was recorded. Final diagnosis: Vaccine-associated paralytic poliomyelitis in the vaccine recipient.

VAPP case 3: Acute flaccid paralysis was registered in a boy on July 20, 2016 at the age of 21 months after the first in his life vaccination with bivalent oral poliovirus vaccine. When choosing the vaccine, the medical staff was guided by the age of the boy, and not by his actual vaccination status. In Russia, in accordance with the National Vaccination Schedule, the inactivated poliovirus vaccine must be used for the first two vaccinations, regardless of the age of the child. Acute flaccid paralysis developed in the course of 12 days after immunization. Vaccine polioviruses types 1 and 3 were isolated from two fecal samples. In blood serum taken late from the onset of paralysis, antibodies to two polioviruses were found in titers: PV1 — 1:256, PV3 — 1:32. On the 60th day of the onset of paralysis, residual paralysis was recorded. Final diagnosis: Vaccine-associated paralytic poliomyelitis in the vaccine recipient.

VAPP case 4: Acute flaccid paralysis in a nonvaccinated child was registered on September 26, 2017 at

Table 2. Isolation of polioviruses and nonpolio enteroviruses from AFP cases and contact persons in 20 provinces of South Vietnam

Years	Number of samples	Number of isolated enteroviruses (PV and NPEV)				
		PV (%)	PV1	PV2	PV3	NPEV (%)
2010	109	1	0	0	1	12
2011–2012	480	7	3	3	1	54
2013–2014	363	2	1	0	1	38
2015–2016	340	8	1	2	5	31
2017–2019	544	4	1	0	3	70
2020–2021	307	0	0	0	0	44
Total	2143	22 (1.0)	6	5	11	249 (11.6)

the age of 11 weeks. The boy was hospitalized in the intensive care unit with tetra paresis and paresis of the muscles of the diaphragm, and was on artificial lung ventilation for a month. Vaccine poliovirus type 3 was isolated from two fecal samples. The antibodies titers against PV3 increased four-fold on the 21st day after the onset of paralysis. We isolated the same poliovirus from the patient's elder sister who received 3 doses of IPV and had high antibodies titer to this poliovirus (1:512). The girl could be the only possible source of poliovirus for this VAPP patient, the source of poliovirus for the girl could not be established. During examination on the 60th day after the onset of paralysis residual paralysis was revealed. Final diagnosis: Vaccine-associated paralytic poliomyelitis in the contact person.

VAPP case 5: The child was vaccinated with the first in his life dose of inactivated vaccine "Polimilex" at the age of 10 months. Acute flaccid paralysis was registered in a boy on December 7, 2018 during his stay in hospital of the Far East. From two fecal samples dated December 7 and 8, 2018 vaccine poliovirus type 3 was isolated. In the blood serum antibodies only to two polioviruses (PV1 — 1:256, PV3 — 1:64) were found. On December 27, 2018 the child was transferred to central hospital for infectious diseases in St. Petersburg. In blood serum taken on the next day, antibodies to three polioviruses were found in titers: PV1 — 1:512, PV2 — 1:64, PV3 — 1:512. The antibodies titers against PV3 increased eight-fold on the 21st day after the onset of paralysis. On the 60th day, the patient had residual paralysis. Final diagnosis: Vaccine-associated paralytic poliomyelitis in the vaccine recipient or in the contact person.

During the surveillance of acute flaccid paralysis in South Vietnam, 2143 fecal samples from children with AFP syndrome from 29 southern provinces of Vietnam were examined and 22 polioviruses (1.0%) were isolated. Most of them, according to the results of intratypic differentiation, were vaccine. Type 2 poliovirus strains isolated from two children in 2012 were classified as vaccine-derived polioviruses based on intratypic differentiation results. Six of the 22 isolated polioviruses were classified as type 1, five as type 2, and eleven viruses (50%) were type 3 polioviruses (Table 2).

It is extremely important that two cases of acute flaccid paralysis registered in 2012 were caused by vaccine-derived polioviruses of type 2. Below you can see the description of these cases:

Case of AFP 1: A child, 19 months old, was not vaccinated against polio. Acute flaccid paralysis in a girl was registered on February 14, 2012 in the district close to the sea with humid tropical climate, poor sanitary conditions and more than 80% of the population of ethnic minorities origin. The girl was sent to hospital. From two patient's samples there were isolated two polioviruses which were classified as VDPV of type 2 according to intratypic differentiation. The results of poliovirus search on the 30th day after the onset of paralysis were negative. On the 60th day, the patient had not residual paralysis. Final diagnosis: Acute flaccid paralysis in the non-vaccinated person.

Case of AFP 2: A child, 5 years old, received two doses of tOPV, the last dose was given more than 30 days before the onset of paralysis. Acute flaccid paralysis was registered on April 17, 2012, in the mountainous district hard to reach for the provision of vaccines. The population of the district consists of 11 ethnic groups. The boy was sent to hospital. From two samples two polioviruses classified as VDPV type 2 were isolated, on the 30th day after the onset of paralysis polioviruses were not found. On examination of the boy on the 60th day after the onset of paralysis, the residual paralysis was not found. Final diagnosis: Acute flaccid paralysis in the not completely vaccinated child.

The number of poliovirus strains isolated from AFP cases in Russia was 60, and it was more than in South Vietnam which was 22 (Fig.).

Discussion and conclusion

The number of registered and completely studied cases of AFP was large in both countries. In Russia in the course of 20 years (from 2002 to 2021) 2492 samples from patients with acute flaccid paralysis syndrome and their close contacts from 14 territories were examined. In Vietnam during 12 years 2143 samples from patients having acute flaccid paralysis from 29 provinces of South Vietnam were investigat-

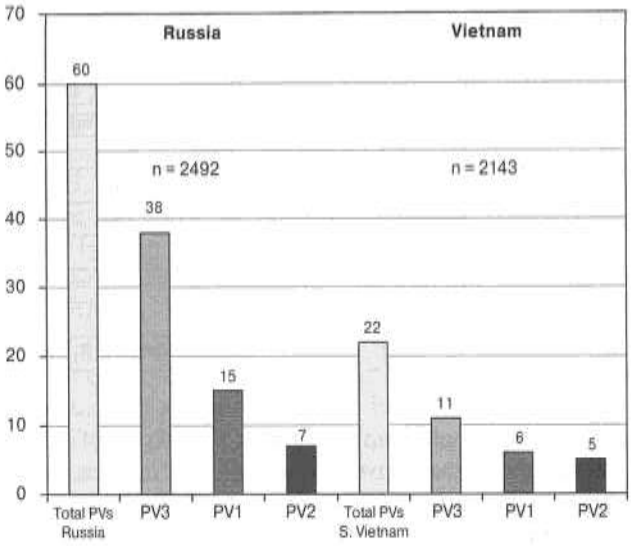


Figure. Polioviruses isolated from AFP cases on 14 territories of Russia and in 29 provinces of South Vietnam

ed. The samples from contact persons were not examined in accordance with the National surveillance system.

In Russia and Vietnam, in the course of surveillance for acute flaccid paralysis during the analyzed periods we isolated vaccine polioviruses of three types with predominance of type 3 polioviruses (63% and 50%, respectively) in both countries. From patients with AFP from Russia, polioviruses were isolated in 4.9% of samples; in Vietnam, only 1.0% of samples contained polioviruses. If we compare the total poliovirus isolation in the two countries over the same period of time from 2010 to 2021, then the ratio of positive for polioviruses samples will remain the same. The percentage of polioviruses isolated in Russia in 2002–2021 (4.9%) or in 2010–2021 (4.5%) statistically exceeded the percentage (1.0%) of poliovirus isolation in 2910–2021 in Vietnam ($p < 0.001$). In Russia four wild type 1 polioviruses were isolated in 2010 from healthy children, who arrived in Saint Petersburg from Tajikistan, as well as various types of VDPV. In Vietnam no wild polioviruses have been identified during 12 years since 2010. From the middle of 2016 in Russia and in Vietnam polioviruses of type 2 have not been isolated. On the contrary the percentage of isolation of nonpoliomyelitis enteroviruses from patients with AFP syndrome in South Vietnam was higher than in Russia (11.6% and 4.3%, respectively) because of extremely high level of enterovirus circulation in South Vietnam, the details will be discussed in the article "Surveillance of acute flaccid paralysis and poliomyelitis in some territories of Russia and in South Vietnam. Part 2. Non-polio enteroviruses and paralysis".

The higher percentage of poliovirus isolation from AFP patients in Russia can be explained by the difference in the National Vaccination Schedules in the two countries. In Russia now each child should receive six polio vaccinations against polio during their lifetime — 2 doses of the inactivated vaccine — at 3 and 4 and a half months, and 4 doses of the oral vaccine — at 6, 18 and 20 months, and then at 6 years. Earlier the 6th dose of OPV was given at the age of 14 [4, 18]. Until May 2016, a three-component OPV was used. Since the global switch to bivalent oral poliovirus vaccine in 2016, all the countries use only bivalent OPV for vaccination. The Vietnamese National Vaccination Schedule earlier provided three doses of OPV at the age of two, three and four months. In September 2018, the additional dose with inactivated vaccine IPV at five months was introduced into the Vaccination schedule of Vietnam, currently the children in Vietnam should receive four vaccinations against poliomyelitis.

There exists the risk for the polio eradication programme, such as the development of AFP and VAPP caused by VDPV in the context of continued use of oral poliovirus vaccine. In Russia in 2002–2021 several cases of VAPP were diagnosed in 14 territories. In 29 provinces of South Vietnam, VAPP cases have not been reported. But two provinces in South Vietnam in 2012 reported one case each of acute flaccid paralysis caused by vaccine-derived polioviruses, VDPV type 2, isolated from sick children.

In order to analyse the causes of VAPP development we choose five cases of VAPP. The cases 1 and 2 demonstrate the contribution of immunodeficiencies to VAPP development. The case 3 shows the consequence of ignoring requirements of the Russian Vaccination Schedule and the lack of alertness of medical personnel. The case 4 gives the example of poliovirus transmission to nonvaccinated child by recipient of IPV without mucosal immunity. The reason for VAPP in the case 5 is unclear, maybe it was not complete vaccination or the use of not adequate vaccine for the immunisation of this child.

It should be noted that in Russia over the 25-year period, cases of VAPP have been repeatedly recorded, they were caused by both vaccine polioviruses and vaccine-derived polioviruses of different types [1, 2, 3, 10]. In the SNL of St. Petersburg, nucleotide substitutions were detected in more than 40 polioviruses isolated from patients with AFP and VAPP since 1998 [13]. In three strains isolated from patients with VAPP, the percentage of nucleotide divergence with vaccine strains in the VP3–2A genome region ranged from 0.7% to 1.4%, and in the VP1 genome region it was 0.9–1.1%, the percentage of amino acid substitutions (0.8–1.4%) was also high [13]. In one child with immunodeficiency (our VAPP case 2) from the 2nd to the 78th days from the onset of paralysis, type 2 polioviruses were isolated. These strains had only 0.2% of nucleotide substitutions, including one neurovirulent mutation (T→C), in the genome region encoding the VP1 protein [6, 7]. The poliovirus, that caused VAPP in the child with paralysis, was a recombinant

strain (S2/S1), it could be formed in a vaccinated child during the replication of polioviruses of different types in intestinal epithelial cells [9, 11, 13]. Just one neurovirulent mutation gave poliovirus an increased possibility to be transmitted to other children [3, 7]. Type 2 polioviruses with the same characteristics were found in four other non-paralyzed children in an adjacent hospital ward. As five children shed such polioviruses, they were detected in sewage samples from the hospital sewer [3, 7]. These results showed that among children' population, with very good vaccination coverage, long-term persistence and circulation of vaccine-derived polioviruses had been possible. Since the number of children receiving OPV in Russia is high, each unvaccinated child is likely to contact with recently vaccinated children who can shed vaccine polioviruses or even VDPV which can become the cause of paralytic disease. The number of VAPP among the recipients of polio vaccine dramatically decreased after the introduction of two IPV doses into the National Vaccination Schedule [4, 18, 25], the risk of VAPP in unvaccinated children still exists.

In 2012 Vietnam also reported two cases of AFP caused by VDPV type 2 in two provinces. Barriers to vaccine delivery as well as inadequate epidemiological and sanitary situation have created the prerequisites for the spread of VDPV type 2, which was isolated from healthy contact children and from sewage water samples in 13 other countries between April 2011 and June 2012 (Update of vaccine-derived polioviruses — worldwide, April 2011 — June 2012).

Another risk for the polio eradication is the decreased mucosal and humoral immunity in vaccinated children. The circulation of VDPV type 3 in an orphanage led to the case of paralytic poliomyelitis caused by this virus in one child was described [12]. The complete genome sequencing was performed for five polioviruses isolated from the patient and three contact children. The level of divergence of the isolates' genomes corresponded to approximately 9–10 months of evolution. The possibility of VDPV3 transmission from poliovirus excretor to susceptible recipients (unvaccinated against polio or vaccinated with inactivated poliovirus vaccine) and circulation in the closed children's group was demonstrated. The study of the blood sera of orphanage residents at least twice vaccinated with IPV revealed the absence of neutralizing antibodies against two poliovirus serotypes in almost 20% of children. Thus the authors of the article [12] showed that the rejection of OPV vaccination can lead to a critical decrease in collective immunity.

When studying the levels of immunity to polioviruses in vaccinated with bOPV vaccine we fixed the decrease of humoral immunity to poliovirus type 2 in children of two age groups (3–4 and 15–17 years old) from one territory of Russia. Below there are the data showing the absence of antibodies to type 2 polioviruses in some children after vaccination with a bivalent poliovirus vaccine (Table 3).

Table 3. The percentage of children vaccinated by bOPV having no anti-PV2 antibodies in the two age groups

Year	Number of children	Children aged 3–4 years	Children aged 15–17 years
2017	204	0	0
2018	202	1%	2%
2019	200	2%	6%
2022	206	8%	3%

Our data also prove that the complete rejection of OPV for vaccination of children may lead to a significant decrease in collective immunity.

Russia and Vietnam are situated in two WHO Regions — European Region and South-East Asia Region. Both regions were certified as polio free regions — EURO in 2002 [5] and SEAR in 2014. Throughout the post-certification period, the polio-free status was maintained on 14 territories of Russia and 29 provinces of South Vietnam. The quality of epidemiological and virological surveillance for acute flaccid paralysis was in accordance with the requirements regulated by the national and international polio surveillance systems. All cases of AFP were revealed, registered, virologically studied and timely reported in both countries.

To prevent the risk of developing vaccine-associated paralytic poliomyelitis, it is indispensable to maintain 95% polio vaccine coverage of children; to comply with sanitary legislation, including the National Vaccination Schedule when vaccinating children and minimize the number of refusals to vaccinate children against poliomyelitis counteracting anti-vaccination propaganda in every way.

Poliomyelitis and AFP surveillance must be continued because the risk of wild poliovirus importation into polio free countries exists till the complete eradication of WPV circulation in the world. It is necessary to strengthen the epidemiological surveillance of poliomyelitis and acute flaccid paralysis, to improve the virological surveillance of polioviruses [23], to continue researches on poliomyelitis, including the development of new safe and effective poliovirus vaccines that can create both humoral and mucosal immunity. The goal of surveillance is to evaluate the circulation of imported wild polioviruses and vaccine-derived polioviruses with nucleotide substitutions. The detection of these pathogenic strains is based on the analysis of poliovirus strains isolated during polio surveillance with the help of classical and new virological and molecular methods. The systematic control of adequate polio vaccination is indispensable in order to prevent transmission of imported wild polioviruses into polio free countries and circulation of vaccine-derived polioviruses all over the world.

References

1. Двадцать лет работы в Глобальной программе ликвидации полиомиелита: аналитический обзор. СПб.: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2018. 88 с. [20 years of work at Global Polio Eradication Initiative. *St. Petersburg, 2018. 88 p. (In Russ.)*]
2. Онищенко Г.Г., Дроздов С.Г., Лялина Л.В., Бичурина М.А., Грачев В.П., Иванова О.Е., Ясинский А.А., Романенкова Н.И., Жебрун А.Б., Чернявская О.П., Воронцова Т.В. Проблемы ликвидации полиомиелита: монография. СПб., 2008. 304 с. [Onishenko G.G., Drozdov S.G., Lyalina L.V., Bichurina M.A., Grachev V.P., Ivanova O.E., Yasinsky A.A., Romanenkova N.I., Zhebrun A.B. Problems of Polio Eradication. *St. Petersburg, 2008. 303 p. (In Russ.)*]
3. Романенкова Н.И., Розаева Н.Р., Бичурина М.А., Канаева О.И., Чхинджерия И.Г. Вакциноассоциированный паралитический полиомиелит и острые вялые параличи на ряде территорий России за двадцатилетний период // Журнал инфектологии. Т. 11, № 3. С. 102–109. [Romanenkova N.I., Rozaeva N.R., Bichurina M.A., Kanaeva O.I., Chkhyndzheriya I.G. Vaccine associated paralytic poliomyelitis and acute flaccid paralysis on some territories of russia during 20 years. *Zhurnal infektologii = Journal Infectology, 2019, vol. 11, no. 3, pp. 102–109. (In Russ.)*] *doi: 10.22625/2072-6732-2019-11-3-102-109*
4. СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». Утв. постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 28.01.2021 № 4. [3.1.2951-11. Sanitary rules for prevention of infectious diseases. Approved by Decree of the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation No. 4 dated 28.01.2021. *(In Russ.)*] *URL: https://www.rospotrebnadzor.ru/files/news/SP_infections_compressed.pdf (19.09.2022)*
5. CDC. Certification of poliomyelitis eradication — European Region, June 2002. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep., 2002, vol. 51, no. 26, pp. 572–574.*
6. Cherkasova E.A., Korotkova E.A., Yakovenko M.L., Ivanova O.E., Eremeeva T.P., Chumakov K.M., Agol V.I. Long-term circulation of vaccine-derived poliovirus that causes paralytic disease. *J. Virol., 2002, vol. 76, no. 13, pp. 6791–6799. doi: 10.1128/JVI.76.13.6791-6799.2002*
7. Cherkasova E.A., Yakovenko M.L., Rezapkin G.V., Korotkova E.A., Ivanova O.E., Eremeeva T.P., Romanenkova N.I., Rozaeva N.R., Sirota I., Agol V.I., Chumakov K.M. Spread of vaccine-derived poliovirus from a paralytic case in an immunodeficient child: an insight into the natural evolution of oral polio vaccine. *J. Virol., 2005, vol. 79, no. 2, pp. 1062–1070. doi: 10.1128/JVI.79.2.1062-1070.2005*
8. Crainic R., Couillin P., Blondel B., Cabau N., Boue A., Horodniceanu F. Natural variation of poliovirus neutralization epitope. *Infect. Immun., 1983, vol. 41, no. 3, pp. 1217–1225. doi: 10.1128/iai.41.3.1217-1225.1983*
9. Cuervo N.S., Guillot S., Romanenkova N., Combiescu M., Aubert-Combiescu A., Seghier M., Caro V., Crainic R., Delpeyroux F. Genomic features of intertypic recombinant Sabin strains excreted by primary vaccinees. *J. Virol., 2001, vol. 75, no. 13, pp. 5740–5751. doi: 10.1128/JVI.75.13.5740-5751.2001*
10. Ivanova O.E., Eremeeva T.P., Morozova N.S., Sahakyan A.K., Kratovo E.A., Kozlovskaya L.I., Baykova O.Y., Krasota A.Y., Gmyl A.P. Vaccine-associated paralytic poliomyelitis in the Russian Federation in 1998–2014. *Int. J. Infect. Dis., 2018, vol. 76, pp. 64–69. doi: 10.1016/j.ijid.2018.08.017*
11. Korotkova E.A., Gmyl A.P., Yakovenko M.L., Ivanova O.E., Eremeeva T.P., Kozlovskaya L.I. A cluster of paralytic poliomyelitis cases due to transmission of slightly diverged Sabin 2 vaccine poliovirus. *J. Virol., 2016, vol.90, no.13, pp. 5978–5988. doi: 10.1128/JVI.00277-16*
12. Korotkova E.A., Prostova M.A., Gmyl A.P., Kozlovskaya L.I., Eremeeva T.P., Baikova O.Y., Krasota A.Y., Morozova N.S., Ivanova O.E. Case of poliomyelitis caused by significantly diverged derivative of the poliovirus type 3 vaccine sabin strain circulating in the orphanage. *Viruses, 2020, vol. 12, no. 9: 970. doi: 10.3390/v12090970*
13. Romanenkova N.I., Guillot S., Rozaeva N.R., Balanant J., Crainic R., Bichurina M., Delpeyroux F. Use of a multiple restriction fragment length polymorphism method for detecting vaccine-derived polioviruses in clinical samples. *J. Clin. Microbiol., 2006, vol. 44, no. 11, pp. 4077–4084. doi: 10.1128/JCM.00017-06*
14. Sabin A.B. Oral poliovirus vaccine: history of its development and use, current strategies to eliminate poliomyelitis from the world. *J. Infect. Dis., 1985, vol. 151, no. 3, pp. 420–436. doi: 10.1093/infdis/151.3.420*
15. Sutter R.W., Kew O.M., Cochi S.L., Aylward R.B. Poliovirus vaccine — live. In: Vaccines. Eds. Plotkin S.A., Orenstein W.A., Offit P.A.; 6th ed. *Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 2013, pp. 598–645.*
16. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res., 1994, vol. 22, no. 22, pp. 4673–4680. doi: 10.1093/nar/22.22.4673*
17. Van der Avoort H.G., Hull B.P., Hovi T.J., Pallansch M.A., Kew O.M., Crainic R., Wood D.J., Mulders M.N., Van Loon A.M. Comparative study of five methods for intratypic differentiation of polioviruses. *J. Clin. Microbiol., 1995, vol. 33, no. 10, pp. 2562–2566. doi: 10.1128/jcm.33.10.2562-2566.1995*
18. Wattigney W.A., Mootrey G.T., Braun M.M., Chen R.T. Surveillance for poliovirus vaccine adverse events, 1991 to 1998: impact of a sequential vaccination schedule of inactivated poliovirus vaccine followed by oral poliovirus vaccine. *Pediatrics, 2001, vol. 107, no. 5: e83. doi: 10.1542/peds.107.5.e83*
19. World Health Organization (WHO). Classification and reporting of vaccine-derived polioviruses (VDPV). GPEI guidelines. 2016. *URL: https://polioeradication.org/wp-content/uploads/2016/09/Reporting-and-Classification-of-VDPVs_Aug2016_EN.pdf*
20. World Health Organization (WHO). Manual for the virological investigation of polio. 4th ed. *Geneva: WHO; 2004. URL: http://whqlibdoc.who.int/hq/2004/ WHO_IVB_04.10.pdf*
21. World Health Organization (WHO). Polio eradication and endgame strategic plan 2013–2018. *URL: http://www.polioeradication.org/Portals/0/Document/Resources/StrategyWork/PEESP_EN_A4.pdf*
22. Yakovenko M.L., Gmyl A.P., Ivanova O.E., Eremeeva T.P., Ivanov A.P., Prostova M.A., Baykova O.Y., Isaeva O.V., Lipskaya G.Y., Shakaryan A.K., Kew O.M., Deshpande J.M., Agol V.I. The 2010 outbreak of poliomyelitis in Tajikistan: epidemiology and lessons learnt. *Eurosurveillance, 2014, vol. 19, no. 7: 20706.*

23. Yakovenko M.L., Korotkova E.A., Ivanova O.E., Eremeeva T.P., Samoilovich E., Uhova I., Gavrilin G.V., Agol V.I. Evolution of the Sabin vaccine into pathogenic derivatives without appreciable changes in antigenic properties: need for improvement of current poliovirus surveillance. *J. Virol., 2009, vol. 83, no. 7, pp. 3402–3406. doi: 10.1128/JVI.02122-08*
24. Yang C.F., De L., Holloway B.P., Pallansch M.A., Kew O.M. Detection and identification of vaccine-related polioviruses by the polymerase chain reaction. *Virus Res., 1991, vol. 20, no. 2, pp. 159–179. doi: 10.1016/0168-1702(91)90107-7*
25. Zhao D., Ma R., Zhou T., Yang F., Wu J., Sun H., Liu F., Lu L., Li X., Zuo S., Yao W., Yin J. Introduction of inactivated poliovirus vaccine and impact on vaccine-associated paralytic poliomyelitis — Beijing, China, 2014-2016. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep., 2017, vol. 66, no. 49, pp. 1357–1361. doi: 10.15585/mmwr.mm6649a4*

Авторы:
Романенкова Н.И., к.м.н., старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник лаборатории этиологии и контроля вирусных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Нгуен Т.Т.Т., д.н., зав. лабораторией энтеровирусов отдела иммунологии и микробиологии, Институт Пастера в Хошимине, г. Хошимин, Вьетнам;
Розаева Н.Р., к.м.н., старший научный сотрудник, старший научный сотрудник лаборатории этиологии и контроля вирусных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Канаева О.И., к.б.н., научный сотрудник лаборатории этиологии и контроля вирусных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Евсеева В.А., научный сотрудник лаборатории этиологии и контроля вирусных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологи имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Бичурина М.А., д.м.н., старший научный сотрудник, зав. лабораторией лаборатории этиологии и контроля вирусных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:
Romanenkova N.I., PhD (Medicine), Senior Researcher, Leading Researcher, Laboratory of Etiology and Control of Viral Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Nguyen T.T.T., MD, Head of Enteroviruses Laboratory, Institut Pasteur in Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh City, Vietnam;
Rozaeva N.R., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Etiology and Control of Viral Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Kanaeva O.I., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Etiology and Control of Viral Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Evseeva V.A., Researcher, Laboratory of Etiology and Control of Viral Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Bichurina M.A., DSc (Medicine), Senior Researcher, Head of the Laboratory of Etiology and Control of Viral Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 31.01.2023
Принята к печати 25.02.2023

Received 31.01.2023
Accepted 25.02.2023

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 2, с. 338–346

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 2, pp. 338–346

АНАЛИЗ ПАРАМЕТРОВ ЛЕЙКОГРАММЫ И ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ КРОВИ ПРИ КЛЕЩЕВЫХ ИНФЕКЦИЯХ РАЗНОЙ ЭТИОЛОГИИ

О.В. Воронкова, Е.Н. Ильинских, Р.Р. Хасанова, И.Е. Есимова, А.Г. Семенов, М.Р. Карпова, Е.А. Мотлохова, Н.А. Чернышов, А.В. Ямпольская, О.В. Ямпольская

ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия

Резюме. *Введение.* Исследования, направленные на выявление особенностей патогенеза клещевых природно-очаговых инфекций в зависимости от их этиологического варианта, актуальны для поиска новых ассоциаций биомаркеров, характеризующих структурный и функциональный фенотип иммунокомпетентных клеток, значимых для дифференциальной диагностики и прогноза заболеваний. Целью работы являлась оценка показателей лейкограммы с расширенным профилем во взаимосвязи с параметрами цитокинового статуса у пациентов с вирусным клещевым энцефалитом и больных с безэритемной формой иксодового клещевого боррелиоза в остром периоде заболевания. *Материалы и методы.* В исследовании приняли участие 28 пациентов с безэритемной формой иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ) и 27 больных клещевым энцефалитом (КЭ) в остром периоде заболевания, а также 16 здоровых лиц (контрольная группа). Исследование венозной крови проводили на анализаторе Sysmex XN1000, в котором реализована технология рефлекс-тестирования с расширенным профилем, позволяющая охарактеризовать реакцию лейкоцитов при инфекции и воспалении, в том числе с помощью таких параметров, как абсолютное и относительное количество незрелых гранулоцитов (IG), показатель гранулярности нейтрофилов (NEUT-GI), показатель реактивности нейтрофилов (NEUT-RI), количество реактивных лимфоцитов (RE-LYMP), количество лимфоцитов, синтезирующих антитела (AS-LYMP). Концентрацию цитокинов IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFNγ и TNFα в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов (АО «Вектор-Бест», Россия). *Результаты.* Установлено, что изменения количественного состава лейкоцитов крови у пациентов с вирусным КЭ и безэритемной формой ИКБ имеют однонаправленную тенденцию и характеризуются повышением числа метаболически активных нейтрофилов (NEUT-RI) и снижением количества реактивных лимфоцитов (RE-LYMP) относительно соответствующих параметров у здоровых лиц. Изменения лейкограммы происходят на фоне высокой концентрации в крови провоспалительных цитокинов IL-8 и TNFα и низкой концентрации IFNγ. Выявлена положительная прямая корреляционная связь между показателем интенсивности флуоресценции, характеризующим метаболическую активность нейтрофильных гранулоцитов (NEUT-RI), и содержанием IL-8 в сыворотке крови как в группе больных КЭ ($r = 0,422$, $p < 0,05$), так и у пациентов с без-

Адрес для переписки:
Воронкова Ольга Владимировна
634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, 2,
ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России.
Тел.: 8 (3822) 90-11-01 (доб. 1945); 8 905 990-47-46 (моб.).
E-mail: Voronkova-ov@yandex.ru

Contacts:
Olga V. Voronkova
634050, Russian Federation, Tomsk, Moskovsky trakt, 2,
Siberian State Medical University.
Phone: +7 (3822) 90-11-01 (add. 1945); +7 905 990-47-46 (mobile).
E-mail: Voronkova-ov@yandex.ru

Для цитирования:
Воронкова О.В., Ильинских Е.Н., Хасанова Р.Р., Есимова И.Е., Семенов А.Г., Карпова М.Р., Мотлохова Е.А., Чернышов Н.А., Ямпольская А.В., Ямпольская О.В. Анализ параметров лейкограммы и цитокинового профиля крови при клещевых инфекциях разной этиологии // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 2. С. 338–346. doi: 10.15789/2220-7619-AOL-5860

Citation:
Voronkova O.V., Ilyinskikh E.N., Hasanova R.R., Esimova I.E., Semenov A.G., Karpova M.R., Motlokhova E.A., Chernyshov N.A., Yampolskaya O.V., Yampolskaya A.V. Analysis of leukogram parameters and blood cytokine profile in tick-borne infections of various etiologies // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 2, pp. 338–346. doi: 10.15789/2220-7619-AOL-5860

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-15-20010 и средств Администрации Томской области.
The study was supported by grant No. 22-15-20010 of the Russian Science Foundation and funds of the Tomsk Oblast Administration.

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-AOL-5860

эритемной формой ИКБ (r = 0,551, p < 0,05). Дополнительно в группе больных с КЭ установлена положительная корреляция между общим количеством лейкоцитов (WBC) и концентрацией TNFα в сыворотке крови (r = 0,532, p < 0,05).

Ключевые слова: *клещевой энцефалит, иксодовый клещевой боррелиоз, безэритемная форма, лейкоциты, лейкограмма, цитокины.*

ANALYSIS OF LEUKOGRAM PARAMETERS AND BLOOD CYTOKINE PROFILE IN TICK-BORNE INFECTIONS OF VARIOUS ETIOLOGIES

Voronkova O.V., Ilyinskikh E.N., Hasanova R.R., Esimova I.E., Semenov A.G., Karpova M.R., Motlokhova E.A., Chernyshov N.A., Yampolskaya O.V., Yampolskaya A.V.

Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Abstract. *Introduction.* Studies aimed at identifying pathogenetic features of tick-borne natural focal infections depending on etiological agent are relevant to seek out for new associations of biomarkers characterizing the structural and functional phenotype of immune cells significant for the differential diagnosis and prognosis of diseases. The aim of the study was to evaluate the parameters of a leukogram with an expanded profile in relation to the parameters of cytokine status in patients with viral tick-borne encephalitis as well as erythemic tick-borne borreliosis at acute stage of the disease. *Materials and methods.* The study involved 28 patients with the non-erythemic tick-borne borreliosis and 27 patients with tick-borne encephalitis at the acute stage of the disease, as well as 16 healthy individuals (control group). Venous blood samples were examined using a Sysmex XN1000 analyzer based on reflex testing technology with extended profile allowing to characterize leukocyte reaction during infection and inflammation, including parameters such as the absolute and relative count of immature granulocytes (IG), neutrophil granularity index (NEUT-GI), neutrophil reactivity index (NEUT-RI), count of reactive lymphocytes (RE-LYMP), count of antibody-producing lymphocytes (AS-LYMP). Concentration of IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFNγ and TNFα in βlood serum was determined by enzyme immunoassay using specific reagent kits (Vector-Best, Russia). *Results.* It was found that changes in the quantitative composition of blood leukocytes in patients with viral tick-borne encephalitis and non-erythemic form of tick-borne borreliosis have a unidirectional tendency characterized by increased count of metabolically active neutrophils (NEUT-RI) and a decreased count of reactive lymphocytes (RE-LYMP) compared to healthy individuals. Changes in the leukogram occur along with high blood concentration of proinflammatory cytokines IL-8 and TNFα and a low level of IFNγ. A positive direct correlation was revealed between the fluorescence intensity parameter characterizing the metabolic activity of neutrophil granulocytes (NEUT-RI) and blood serum IL-8 level both in tick-borne encephalitis (r = 0.422, p < 0.05) and non-erythemic form of tick-borne borreliosis (r = 0.551, p < 0.05). Additionally, in the former, a positive correlation was established between the total leukocyte count (WBC) and concentration of TNFα in τhe blood serum (r = 0.532, p < 0.05).

Key words: *tick-borne encephalitis, tick-borne borreliosis, non-erythemic form, leukocytes, leukogram, cytokines.*

Введение

Наиболее значимая доля в структуре заболеваемости природно-очаговыми инфекциями на большинстве эндемичных территорий Российской Федерации приходится на вирусный клещевой энцефалит (КЭ) и иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ) [13]. Проблема ранней диагностики вирусных и бактериальных инфекций, передаваемых иксодовыми клещами, не теряет своей актуальности, несмотря на внедрение в клиническую практику высокочувствительных молекулярно-генетических методов. По данным литературы, доля этиологически неверифицированных клинических случаев лихорадочных заболеваний, развивающихся после присасывания клеща, в некоторых регионах составляет до 56% [16]. Например, раннюю дифференциальную диагностику вирусного КЭ и ИКБ, протекающего без развития мигрирующей эритемы, затрудняют сходство основных клинических проявлений на начальных этапах инфекции при поздней сероконверсии специфических антител [1].

Изменения параметров периферической крови являются интегральными показателями состояния организма, и, несмотря на совершенствование имеющихся и создание новых методов лабораторной диагностики заболеваний, классический метод исследования количественных и функциональных параметров клеточных элементов крови, отражающих реакцию одной из основных защитных систем организма, не теряет своей актуальности и остается основой клинического диагноза. К настоящему времени накоплено большое количество экспериментальных и клинических данных, характеризующих изменения лейкоцитарного состава и цитокинового статуса крови при клещевых инфекциях [2, 8, 11, 20, 21]. При этом отсутствует комплексное систематизированное представление об иммунопатогенетических особенностях отдельных этиологических вариантов клещевых инфекций. В опубликованных материалах наблюдается

сильная вариабельность как значений анализируемых количественных параметров, так и подходов к их интерпретации с позиции разнонаправленных механизмов иммуноцитокиновой регуляции при разных клещевых инфекциях. Объективными являются причины как клинического характера (внутригрупповые возрастно-половые различия, разнообразие клинических форм внутри одной нозологической группы, зависимость патогенеза и клинической картины от биологических особенностей инфицирующего штамма возбудителя, от периода заболевания, от индивидуальных особенностей иммунологической реактивности, от исходного иммунного статуса пациента, от географических региональных особенностей инфекционной патологии), так и методологического свойства (использование разных методов и наборов для детекции целевых клеток и молекул, сильная внутригрупповая вариабельность значений уровня цитокинов, отсутствие сравнения с контрольной группой, использование разных методов статистической обработки количественных данных). Все это определяет необходимость продолжения исследований, направленных на выявление особенностей иммунопатогенеза клещевых инфекций в зависимости от их этиологического варианта, для поиска новых ассоциаций биомаркеров, характеризующих структурный и функциональный фенотип иммунокомпетентных клеток, значимых для верификации и прогноза заболеваний.

Целью настоящего исследования являлась оценка показателей лейкограммы с расширенным профилем во взаимосвязи с параметрами цитокинового статуса у пациентов с вирусным клещевым энцефалитом и больных с безэритемной формой иксодового клещевого боррелиоза в остром периоде заболевания.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 55 пациентов, госпитализированных в инфекционную клинику с лихорадкой и наличием в анамнезе факта присасывания клеща. Обследование пациентов включало общеклинические лабораторные исследования и метод твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с определением IgM и IgG к *Borrelia burgdorferi* s.l. и к вирусу КЭ, а также антигена вируса КЭ. Ретроспективно по результатам дифференциальной диагностики были сформированы группы сравнения. В первую группу вошли 28 пациентов с безэритемной формой ИКБ (средний возраст: 46,52±3,21 лет), вторую группу составили 27 больных с лихорадочной и менингеальной формой КЭ (средний возраст: 46,45±2,16 лет). Контрольную группу составили 16 здоровых добровольцев (средний возраст: 47,28±3,14 лет). Все пациенты и здоровые лица подписали информированное согласие на участие в исследовании (одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, протокол № 9119/1 от 30.05.2022 г.).

Материалом для исследования являлась венозная кровь. Взятие крови осуществляли в день поступления пациентов в стационар. Общеклинический анализ крови проводили на гематологическом анализаторе Sysmex XN1000 (Sysmex Corp., Япония), в котором реализована технология рефлекс-тестирования с расширенным профилем, позволяющая охарактеризовать реакцию лейкоцитов при инфекции и воспалении. Были исследованы следующие параметры: общее количество лейкоцитов в крови (WBC), абсолютное и относительное количество отдельных морфологических форм лейкоцитов (нейтрофильных (NEUT), эозинофильных (EO) и базофильных (BASO) гранулоцитов, лимфоцитов (LYMPH), моноцитов (MONO), абсолютное и относительное количество незрелых гранулоцитов (IG), показатель гранулярности нейтрофилов (NEUT-GI), показатель реактивности нейтрофилов (NEUT-RI), количество реактивных лимфоцитов (RE-LYMP), количество лимфоцитов, синтезирующих антитела (AS-LYMP).

Концентрацию цитокинов IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFNγ и TNFα в сыворотке крови определяли методом ИФА с использованием наборов реагентов (АО «Вектор-Бест», Россия).

Статистическую обработку результатов проводили в программе STATISTICA 12.0 (StatSoft, США). Данные, подчиняющиеся нормальному закону распределения (тест Шапиро–Уилка), представляли в виде среднего и стандартного отклонения (M±SD), не подчиняющиеся — медианы (Me) и межквартильного интервала (Q1; Q3). Анализ различий между выборками выполняли при помощи t-критерия Стьюдента либо U-критерия Манна–Уитни с поправкой Бонферрони. При уровне значимости $p < 0,05$ различия двух сравниваемых величин считали статистически значимыми. Для оценки взаимосвязи между показателями определяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r).

Результаты

При сравнении количественных параметров лейкоцитарного звена у пациентов с клещевыми инфекциями и здоровых лиц статистически значимое увеличение общего числа лейкоцитов в крови было зарегистрировано только в группе больных КЭ (табл. 1). Изменение числа лейкоцитов происходило за счет повышения абсолютного и относительного количества нейтрофиль-

ных гранулоцитов и снижения относительного числа лимфоцитов. В группе пациентов с ИКБ большинство количественных параметров лейкоцитарного звена периферической крови было сопоставимо с контрольными значениями. При этом у всех больных клещевыми инфекциями, вне зависимости от этиологического варианта заболевания, было зарегистрировано статистически значимое повышение в среднем в 1,2 раза по сравнению со значениями у здоровых лиц показателя реактивности нейтрофильных гранулоцитов (NEUT-RI), характеризующего метаболическую активность клеток по интенсивности флюоресценции популяции (табл. 1). Также у пациентов обеих групп было зарегистрировано в равной степени значимое снижение количества реактивных лимфоцитов (RE-LYMP) при полном отсутствии в крови антителосинтезирующих В-лимфоцитов (AS-LYMP) (табл. 1).

При анализе содержания цитокинов в крови было обнаружено статистически значимое повышение концентрации провоспалительного IL-8 у пациентов обеих групп по сравнению с параметрами в группе здоровых лиц (табл. 2). Наиболее высокий уровень цитокина был зарегистрирован в группе больных ИКБ — концентрация IL-8 в среднем в 2 раза превышала таковую у пациентов с КЭ (p_2 = 0,041). Наряду с этим было зарегистрировано значительное повышение (в среднем в 6,7 раза по сравнению со значениями в контрольной группе) концен-

Таблица 1. Общее количество лейкоцитов и показатели лейкограммы с расширенным профилем у пациентов с клещевыми инфекциями, M±SD

Table 1. Total blood leukocyte count and leukogram parameters with an expanded profile in patients with tick-borne infections, M±SD

Параметры Parameters			**Здоровые лица** Healthy persons **n = 16**	**Пациенты с КЭ** Patients with tick-borne encephalitis **n = 27**	**Пациенты с безэритемной формой ИКБ** Patients with non-erythemal form of ixodic tick-borne borreliosis **n = 28**
Общее количество лейкоцитов в крови (WBC), × 10^9/л Total blood leukocytes count (WBC), × 10^9/l			5,17±1,48	7,13±1,85 p_1 = 0,026	6,07±1,41
Количественный состав клеток Leukocyte blood count	**Эозинофильные гранулоциты (EO)** Eosinophilic granulocytes (EO)	%	2,80±1,50	2,11±0,44	3,56±0,82
		× 10^9/l	0,14±0,08	0,13±0,19	0,22±0,18
	Зрелые нейтрофильные гранулоциты (NEUT) Mature neutrophilic granulocytes (NEUT)	%	52,78±6,93	62,67±6,39 p_1 = 0,015	51,94±3,71 p_2 = 0,012
		× 10^9/l	2,76±0,94	4,32±1,00 p_1 = 0,011	3,19±1,10
	Лимфоциты (LYMPH) Lymphocytes (LYMPH)	%	35,14±3,40	27,39±3,65 p_1 = 0,008	34,25±4,89 p_2 = 0,008
		× 10^9/l	1,79±0,16	1,89±0,15	2,04±0,16
	Моноциты (MONO) Monocytes (MONO)	%	8,44±1,33	7,54±1,21	9,58±1,84
		× 10^9/l	0,44±0,16	0,49±0,15	0,57±0,13
	Базофильные гранулоциты (BASO) Basophilic granulocytes (BASO)	%	0,84±0,20	0,29±0,30	0,68±0,25
		× 10^9/l	0,04±0,01	0,02±0,02	0,04±0,02
	Незрелые нейтрофильные гранулоциты (IG) Immature neutrophilic granulocytes (IG)	%	Нет данных	0,30±0,04	0,30±0,07
		× 10^9/l	Нет данных	0,02±0,01	0,02±0,02
Показатель цитоплазматической гранулярности нейтрофилов (NEUT-GI, ед. интенсивности рассеяния света, SI) Neutrophil granularity intensity (NEUT-GI, scatter intensity, SI)			151,34±2,94	150,27±6,30	153,10±3,83
Показатель реактивности нейтрофилов (NEUT-RI, ед. интенсивности флуоресценции, FI) Neutrophil reactivity intensity (NEUT-RI, fluorescence intensity, FI)			39,16±2,60	46,63±1,15 p_1 = 0,012	46,94±2,07 p_1 = 0,009
Количество реактивных лимфоцитов (RE-LYMP, × 10^9/л) Reactive lymphocytes count (RE-LYMP, × 10^9/l)			0,90 ±0,11	0,08±0,02 p_1 = 0,005	0,06±0,02 p_1 = 0,001
Количество лимфоцитов, синтезирующих антитела (AS-LYMP, × 10^9/л) Antibody-secreting reactive lymphocytes count (AS-LYMP, × 10^9/l)			0,0	0,0	0,0

Примечание. Здесь и в табл. 2: p_1 — уровень значимости различий при сравнении с параметрами у здоровых лиц; p_2 — уровень значимости различий при сравнении с параметрами у пациентов с КЭ.

Note. Here and in Table 2: p_1 — significance level of differences compared with parameters in healthy donors; p_2 — significance level of differences compared with parameters in patients with tick-borne encephalitis.

трации TNFα, в равной степени характерное как для пациентов с КЭ, так и для больных ИКБ. Независимо от этиологического варианта инфекции у всех обследованных пациентов было обнаружено снижение содержания в крови IFNγ относительно параметров у здоровых лиц (табл. 2).

Статистически значимое снижение по сравнению с контрольными значениями концентрации IL-10 в сыворотке крови было зарегистрировано в группе пациентов с ИКБ (в среднем в 4,6 раза, $p_t = 0{,}017$).

Обсуждение

Как известно, любое инфекционное заболевание является результатом сложного взаимодействия патогена с факторами врожденного и адаптивного иммунитета организма хозяина [15]. Врожденная неспецифическая резистентность, основными механизмами которой являются фагоцитоз и воспаление, обеспечивает защиту на ранних этапах инфекции. Ведущая роль в формировании специфических и неспецифических реакций, в определении резистентности и реактивности организма, в том числе при инфекционном процессе, принадлежит системе крови [19].

К настоящему времени опубликовано несколько работ, в которых обсуждаются алгоритмы ранней дифференциальной диагностики клинических форм клещевых инфекций в остром периоде заболевания, основанные на использовании в качестве критериев количественных параметров гемограммы, а также показателей, характеризующих функциональную активность лейкоцитов, например, таких как лейкоцитарные индексы интоксикации по Я.Я. Кальф-Калифу и С.Ф. Химичу, абсолютное количество $CD3^+$-, $CD4^+$-, $CD8^+$-лимфоцитов, количество фагоцитирующих нейтрофилов и фагоцитарное число и др. Ранее было установлено, в том числе в наших собственных исследованиях, что модели логистической регрессии, разработанные с использованием некоторых гематологических параметров, демонстрируют высокую информативность, например, для оценки вероятности развития у пациента вариантов клещевых инфекций: безэритемной формы иксодового клещевого боррелиоза или сочетанного течения боррелиозно-энцефалитной инфекции как в периоде разгара заболевания, так и в периоде реконвалесценции [5, 10, 14, 25].

В настоящем исследовании в результате анализа количественных показателей периферической крови у больных КЭ и безэритемной формой ИКБ мы установили повышение по сравнению с показателями в группе здоровых доноров общего количества лейкоцитов в крови только у пациентов с КЭ (табл. 1). Изменения в гемограмме у пациентов данной группы характеризовались повышением абсолютного и относительного числа нейтрофильных гранулоцитов и снижением относительного количества лимфоцитов. Поскольку значения WBC и гемограммы не выходили за границы референтных интервалов, трактовать выявленные изменения как лейкоцитоз с изменением числа отдельных морфологических форм некорректно. В этом случае целесообразной представляется оценка значимости выявленных изменений гемограммы в комплексе с другими параметрами, характеризующими интенсивность системной воспалительной реакции при различных вариантах клещевых инфекций.

Технология рефлекс-тестирования с расширенным профилем, реализованная в современных автоматических гематологических анализаторах, позволяет охарактеризовать не только количественный, но и качественный состав лейкоцитов крови внутри морфологических групп. Диагностические возможности новых параметров цитофлуориметрического анализа клеток крови, характеризующих их функциональность на основе размера, различий во внутренней структуре, зернистости, активно изучаются при многих патологических состояниях, например, при диагностике сепсиса у больных с политравмой, аутоиммунными заболеваниями, гепатитом и у иммунокомпрометированных лиц и др. [18, 23, 26].

В частности, для определения статуса активации клеток иммунной системы в лабораторной диагностике используют такие дескрипторы, как гранулярность (NEUT-GI) и реактивность нейтрофилов (NEUT-RI), количество реактивных (RE-LYMP) и антителосинтезирующих В-лимфоцитов (AS-LYMP). В настоящее время уже имеются данные о том, что изменения этих параметров зависят от характера воспалительного стимула, интенсивности и стадии инфекции, и могут быть полезны для дифференциальной диагностики между бактериальной и вирусной инфекцией [22, 24, 26].

В доступной литературе отсутствуют данные об изменениях дополнительных параметров, определяемых с использованием цитофлуориметрических методик и составляющих расширенный профиль гемограммы, при клещевых природно-очаговых инфекциях. В результате проведенного исследования мы установили, что изменения количественного состава лейкоцитов периферической крови у пациентов как с КЭ, так и с безэритемной формой ИКБ имеют однонаправленную тенденцию и характеризуются повышением числа метаболически активных нейтрофилов (NEUT-RI) и снижением количества реактивных лимфоцитов (RE-LYMP)

Таблица 2. Концентрация цитокинов в сыворотке крови у пациентов с клещевыми инфекциями, Me (Q1; Q3)

Table 2. Blood serum cytokines concentration in the in patients with tick-borne infections, Me (Q1; Q3)

Концентрация цитокинов, пг/мл Cytokine concentration, pg/ml	**Здоровые лица** Healthy donors **n = 16**	**Пациенты с КЭ** Patients with tick-borne encephalitis **n = 27**	**Пациенты с безэритемной формой ИКБ** Patients with non-erythemal form of ixodic tick-borne borreliosis **n = 28**
IL-2	1,20 (0,21; 1,75)	2,40 (1,23; 5,33)	2,09 (0,94; 5,90)
IL-4	1,24 (1,12; 1,45)	1,34 (1,23; 2,43)	1,32 (1,13; 2,80)
IL-6	2,41 (1,55; 3,98)	3,10 (2,87; 12,32)	2,83 (2,54; 3,87)
IL-8	8,28 (4,20; 11,60)	17,95 (7,79; 52,57) $p_1 = 0,034$	35,45 (21,45; 44,24) $p_1 = 0,009$; $p_2 = 0,041$
IL-10	5,31 (2,80; 7,00)	2,35 (1,75; 2,77)	1,27 (1,23; 1,46) $p_1 = 0,017$
IFNγ	5,78 (2,54; 8,36)	1,28 (1,04; 2,01) $p_1 = 0,006$	1,24 (1,20; 1,87) $p_1 = 0,011$
TNFα	0,82 (0,74; 1,69)	6,32 (5,98; 10,41) $p_1 = 0,002$	5,11 (2,17; 7,52) $p_1 = 0,032$

относительно параметров у здоровых лиц (табл. 1). Повышение функциональной активности нейтрофилов представляется вполне закономерным и характеризует острую фазу воспаления на начальном этапе развития любой инфекции как бактериальной, так и вирусной. Следует отметить, что повышение функциональной активности нейтрофилов у обследованных нами пациентов происходило на фоне высокой концентрации провоспалительных цитокинов IL-8 и TNFα в крови. Мы установили наличие положительной прямой корреляционной взаимосвязи связи между показателем интенсивности флуоресценции, характеризующим метаболическую активность нейтрофильных гранулоцитов, и содержанием IL-8 в сыворотке крови как в группе больных КЭ ($r = 0,422$, $p < 0,05$), так и у пациентов с безэритемной формой ИКБ ($r = 0,551$, $p < 0,05$).

По данным литературы известно, что IL-8 является одним из центральных регулирующих звеньев в механизмах хемоаттракции нейтрофильных гранулоцитов, а также выступает как быстродействующий активатор, обусловливающий дегрануляцию нейтрофилов, развитие респираторного взрыва, выход лизосомальных ферментов, увеличение экспрессии поверхностных рецепторов, продукцию и секрецию арахидоновой кислоты и ее метаболитов в клетках [17, 19]. Значимую роль IL-8 играет в иммунопатогенезе клещевых инфекций. В исследованиях Н.С. Миноранской и соавт. (2014), посвященных изучению механизмов иммуноцитокиновой регуляции при сочетанной боррелиозно-энцефалитной инфекции, сделан вывод о том, что уровень продукции IL-8 можно рассматривать в качестве критически важного критерия для прогноза и дифференциальной диагностики различных форм ИКБ — изолированной и сочетанной с КЭ [11].

По результатам проведенного корреляционного анализа, у пациентов с КЭ мы выявили положительную корреляцию между общим количеством лейкоцитов (WBC) и концентрацией TNFα в сыворотке крови ($r = 0,532$, $p < 0,05$).

Известно, что на фоне инфекции провоспалительные свойства TNFα реализуются как на локальном, так и на системном уровнях. При этом TNFα индуцирует синтез острофазных белков в гепатоцитах, продукцию медиаторов воспаления, про- и противовоспалительных цитокинов в иммунокомпетентных клетках, активирует фагоцитирующие, антигенпредставляющие, цитотоксические и антителосинтезирующие клетки, а также увеличивает адгезионные свойства сосудистого эндотелия, способствуя развитию перераспределительного лейкоцитоза [4].

В разной степени выраженное повышение концентрации TNFα в сыворотке крови у больных с различными формами клещевого энцефалита, ИКБ и при их сочетании ранее уже было зарегистрировано в ряде клинических исследований. При этом значения концентрации TNFα варьировали в широких пределах в среднем от 45 пг/мл до 301,1±12,5 пг/мл [2, 8, 11, 20]. В крови у обследованных нами пациентов концентрация цитокина не превышала в среднем 7,0 пг/мл, что, на наш взгляд, на фоне развернутой клинической картины заболевания, свидетельствует о недостаточной функциональной активности клеток системы мононуклеарных фагоцитов, являющихся основными продуцентами цитокина. На основе полученных данных также можно сделать предположение о нарушении кооперативного взаимодействия регуляторных и эффекторных клеток в процессе реализации иммунного ответа, поскольку мы не зарегистрировали синергического эффекта высоких концентраций TNFα в отношении секреции

других провоспалительных цитокинов, таких как IL-2 и IL-6, а также противовоспалительного IL-10, уровень которого у пациентов с ИКБ оказался даже ниже контрольных значений (табл. 2). Кроме того, отсутствовала корреляционная взаимосвязь между значениями концентрации IL-8 и уровнем TNFα в крови у обследованных пациентов. Факторы врожденной неспецифической резистентности обеспечивают не только защиту на ранних этапах инфекции, но и развитие последующего специфического адаптивного иммунного ответа в зависимости от способа презентации антигенов и индукции экспрессии генов цитокинов. Установлено, что достаточная эффективность противовирусного и антибактериального иммунитета находится в прямой зависимости от уровня активности клеток системы мононуклеарных фагоцитов и наработки иммунорегуляторных цитокинов, обеспечивающих кооперативное взаимодействие иммунокомпетентных клеток в процессе иммунного ответа [3, 6, 7, 12, 17].

Как показали результаты исследования, у пациентов с клещевыми инфекциями уровень цитокинов, являющихся продуктами Т-хелперных клонов лимфоцитов (IL-2 и IL-4) не отличался от такового у здоровых лиц, а концентрация IFNγ оказалась даже ниже контрольных значений. Одной из основных функций IFNγ является активация эффекторного потенциала макрофагов, их микробицидности и цитотоксичности, продукции цитокинов, супероксидных и нитроксидных радикалов, простагландинов. IFNγ повышает экспрессию антигенов MHC I и II классов на разных клетках, может индуцировать экспрессию этих молекул на тех клетках, которые не экспрессируют их конститутивно, повышает функциональную активность цитотоксических $CD8^+$ Т-лимфоцитов [9]. Таким образом, зарегистрированные нами изменения цитокинового фона в сочетании со снижением в крови количества активированных лимфоцитов в острый период заболевания у больных с клещевыми инфекциями вероятно следует рассматривать как фактор, свидетельствующий о несостоятельности клеточного звена иммунореактивности и нарушении лимфоцит-опосредованных реакций защиты.

Заключение

В результате проведенного исследования установлено, что изменения количественного состава лейкоцитов периферической крови у пациентов с вирусным КЭ и безэритемной формой ИКБ носят однонаправленный характер и характеризуются повышением в среднем в 1,2 раза числа метаболически активных нейтрофилов (NEUT-RI) и снижением количества реактивных лимфоцитов (RE-LYMP) относительно параметров у здоровых лиц. Изменения лейкограммы у обследованных пациентов происходили на фоне высокой концентрации провоспалительных цитокинов IL-8 и TNFα и низкой концентрации IFNγ в крови. В результате корреляционного анализа выявлена положительная прямая связь между показателем интенсивности флуоресценции, характеризующим метаболическую активность нейтрофильных гранулоцитов (NEUT-RI), и содержанием IL-8 в сыворотке крови как в группе больных КЭ ($r = 0,422$, $p < 0,05$), так и у пациентов с безэритемной формой ИКБ ($r = 0,551$, $p < 0,05$). Дополнительно в группе больных с КЭ установлена положительная корреляция между общим количеством лейкоцитов (WBC) и концентрацией TNFα в сыворотке крови ($r = 0,532$, $p < 0,05$).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы/References

1. Андронова Н.В., Миноранская Н.С., Миноранская Е.И. Специфический иммунный ответ и некоторые отдаленные результаты при остром течении иксодового клещевого боррелиоза и микст-инфекции клещевого энцефалита и иксодового клещевого боррелиоза // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). 2011. Т. 100, № 1. С. 54–57. [Andronova N.V., Minoranskaya N.S., Minoranskaya E.I. Specific immune response and some long-term results in the acute course of ixodic tick-borne borreliosis and mixed infection of tick-borne encephalitis and ixodic tick-borne borreliosis. *Sibirskii meditsinskii zhurnal (Irkutsk) = Siberian Medical Journal (Irkutsk), 2011, vol. 100, no. 1, pp. 54–57. (In Russ.)*]
2. Бедарева Т.Ю., Попонникова Т.В., Галиева Г.Ю., Пиневич О.С., Вахрамеева Т.Н. Изменения цитокинового статуса в остром периоде клещевых нейроинфекций у детей // Бюллетень сибирской медицины. 2009. Т. 8, № 1–2. С. 10–14. [Bedareva T.Yu., Poponnikova T.V., Galiyeva G.Yu., Pinevich O.S., Vakhrameyeva T.N. Changing of cytokine status in acute period of tick-borne neuroinfections in children. *Byulleten' sibirskoi meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine, 2009, vol. 8, no. 1–2, pp. 10–14. (In Russ.)*] *doi: 10.20538/1682-0363-2009-1(2)-10-14*
3. Бикетов С.Ф., Фирстова В.В., Любимов И.И. Особенности этиологии и иммунопатогенеза иксодовых клещевых боррелиозов // Проблемы особо опасных инфекций. 2009. Т. 3, № 101. С. 44–49. [Bicketov S.F., Firstova V.V., Lyubimov I.I. Ethiology and immunopathogenesis peculiarities of ixodic tick-borne borreliosis. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections, 2009, vol. 3, no. 101, pp. 44–49. (In Russ.)*] *doi: 10.21055/0370-1069-2009-3(101)-44-49*
4. Воронина Е.В., Лобанова Н.В., Яхин И.Р., Романова Н.А., Серегин Ю.А. Роль фактора некроза опухолей-альфа в иммунопатогенезе заболеваний различной этиологии и его значимость в развитии антицитокиновой терапии моноклональ-

ными антителами // Медицинская иммунология. 2018. Т. 20, № 6. С. 797–806. [Voronina E.V., Lobanova N.V., Yakhin I.R., Romanova N.A., Seregin Yu.A. Role of tumor necrosis factor alpha in immune pathogenesis of different diseases and its significance for evolving anticytokine therapy with monoclonal antibodies. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2018, vol. 20, no. 6, pp. 797–806. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-797-806*

5. Ильинских Е.Н., Филатова Е.Н., Буланьков Ю.И., Некрасов В.Н., Решетова А.В., Портнягина Е.В., Аксенов С.В., Воронкова О.В., Мотлохова Е.А., Ильянова И.Н. Прогностическая значимость общеклинического анализа крови для ранней диагностики микст-инфекции безэритемной формы иксодового клещевого боррелиоза и клещевого энцефалита // Журнал инфектологии. 2022. Т. 14, № 4. С. 69–76. [Ilyinskikh E.N., Filatova E.N., Bulankov Yu.I., Nekrasov V.N., Reshetova A.V., Portnyagina E.V., Aksyonov S.V., Voronkova O.V., Motlokhova E.A., Ilyanova I.N. Predictive value of complete blood count for early diagnosis of mixed infection of the non-erythema migrans form of Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis. *Zhurnal infektologii = Journal Infectology, 2022, vol. 14, no. 4, pp. 69–76. (In Russ.)*] *doi: 10.22625/2072-6732-2022-14-4-69-76*
6. Крылова Н.В., Леонова Г.Н. Некоторые особенности иммунопатогенеза клещевого энцефалита // Тихоокеанский медицинский журнал. 2007. № 3. С. 21–25. [Krylova N.V., Leonova G.N. Some features of the immunopathogenesis of tick-borne encephalitis. *Tikhookeanskii meditsinskii zhurnal = Pacific Medical Journal, 2007, no. 3, pp. 21–25. (In Russ.)*]
7. Крылова Н.В. Формирование врожденного и адаптивного иммунного ответа под влиянием разных флавивирусных вакцин // Медицинская иммунология. 2015. Т. 17, № 2. С. 109–118. [Krylova N.V. Formation of innate and adaptive immune response under the influence of different flavivirus vaccines. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2015, vol. 17, no. 2, pp. 109–118. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/1563-0625-2015-2-109-118*
8. Леонова Г.Н., Павленко Е.В., Запорожец Т.С., Смолина Т.П., Гажа А.К., Новиков Д.В., Ченцова И.В., Крылова Н.В. Комплексная оценка состояния иммунной системы при различных формах клещевого энцефалита в остром периоде // Медицинская иммунология. 2012. Т. 14, № 4–5. С. 313–320. [Leonova G.N., Pavlenko E.V., Zaporozhets T.S., Smolina T.P., Gaz A.K., Novikov D.V., Chentsova I.V., Krylova N.V. Comprehensive assessment of the immune system in various forms of tick-borne encephalitis in the acute period. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2012, vol. 14, no. 4–5, pp. 313–320. (In Russ.)*]
9. Луцкий А.А., Жирков А.А., Лобзин Д.Ю., Рао М., Алексеева Л.А., Мейрер М., Лобзин Ю.В. Интерферон-γ: биологическая функция и значение для диагностики клеточного иммунного ответа // Журнал инфектологии. 2015. Т. 7, № 4. С. 10–22. [Lutckii A.A., Zhirkov A.A., Lobzin D.Yu., Rao M., Alekseeva L.A., Maeurer M., Lobzin Yu.V. Interferon-γ: biological function and application for study of cellular immune response. *Zhurnal infektologii = Journal Infectology, 2015, vol. 7, no. 4, pp. 10–22. (In Russ.)*] *doi: 10.22625/2072-6732-2015-7-4-10-22*
10. Миноранская Н.С., Сарап П.В., Андронова Н.В., Миноранская Е.И. Клинико-лабораторные предикторы прогноза исходов иксодовых клещевых боррелиозов // Вестник РАМН. 2015. Т. 70, №3. С. 378–385. [Minoranskaya N.S., Sarap P.V., Andronova N.V., Minoranskaya E.I. Clinical and laboratory predictors for forecasting the outcomes of ixodes tick-borne borreliosis. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences, 2015, vol. 70, no. 3, pp. 378–385. (In Russ.)*] *doi: 10.15690/vramn.v70i3.1337*
11. Миноранская Н.С., Сарап П.В., Миноранская Е.И. Механизмы иммуноцитокиновой регуляции в патогенезе иксодовых клещевых боррелиозов // Вестник РАМН. 2014. Т. 69, № 9–10. С. 110–116. [Minoranskaya N.S., Sarap P.V., Minoranskaya E.I. Mechanisms of immune and cytokine regulation in pathogenesis of ixodes tick-borne borreliosis. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences, 2014, vol. 69, no. 9–10, pp. 110–116. (In Russ.)*] *doi: 10.15690/vramn.v69i9-10.1139*
12. Морозова О.В., Исаева Е.И. Врожденный и адаптивный иммунитет при инфекции и иммунизации инактивированной вакциной против клещевого энцефалита // Молекулярная медицина. 2021. Т. 19, № 6. С. 43–48. [Morozova O.V., Isaeva E.I. Innate and adaptive immunity during infection and immunization with inactivated tick-borne encephalitis vaccine. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine, 2021, vol. 19, no. 6, pp. 43–48. (In Russ.)*] *doi: 10.29296/24999490-2021-06-07*
13. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2021 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2022. 340 с. [On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2021: State Report. *Moscow: Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Well-Being, 2022. 340 p. (In Russ.)*]
14. Патент № 2647450 Российская Федерация, МПК G01N 33/53 (2006.01). Способ оценки вероятности развития у пациента вариантов клещевых инфекций: безэритемной формы иксодового клещевого боррелиоза или сочетанного течения боррелиозно-энцефалитной инфекции: № 2017114768; заявлено 2017.04.26: опубликовано 2018.03.15 / Миноранская Н.С., Сарап П.В. Патентообладатель: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства Здравоохранения Российской Федерации (RU). 13 с. [Patent No. 2647450 Russian Federation, Int. Cl. G01N 33/53 (2006.01). Method for assessing likelihood of patient developing variants of tick-borne infections: non-erythematous form of ixodid tick-borne borreliosis or combined course of borreliosis-encephalitis infection. No. 2017114768; application: 2017.04.26: date of publication 2018.03.15 / Minoranskaya N.S., Sarap P.V. Proprietor: Federal'noe gosudarstvennoe byudzhetnoe obrazovatel'noe uchrezhdenie vysshego obrazovaniya «Krasnoyarskii gosudarstvennyi meditsinskii universitet imeni professora V.F. Voino-Yasenetskogo» Ministerstva Zdravookhraneniya Rossiiskoi Federatsii (RU). 13 p.]
15. Пинегин Б.В., Пащенков М.В., Пинегин В.Б., Хаитов Р.М. Эпителиальные клетки слизистых оболочек и новые подходы к иммунопрофилактике и иммунотерапии инфекционных заболеваний // Иммунология. 2020. Т. 41, № 6. С. 486–500. [Pinegin B.V., Pashenkov M.V., Pinegin V.B., Khaitov R.M. Mucosal epithelial cells and novel approaches to immunoprophylaxy and immunotherapy of infectious diseases. *Immunologiya = Immunologiya, 2020, vol. 41, no. 6, pp. 486–500. (In Russ.)*] *doi: 10.33029/0206-4952-2020-41-6-486-500*
16. Семенов В.А., Хохлова З.А., Этенко Д.А., Бондаренко Т.Е., Кудашева С.В., Старченкова Т.Е. Неверифицированные клещевые инфекции // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2020. Т. 9, № 4. С. 103–109. [Semenov V.A., Khokhlova Z.A., Etenko D.A., Bondarenko T.E., Kudasheva S.E., Starchenkova T.E. Non-verified tick-borne infections.

Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie = Infectious Diseases: News, Opinions, Training, 2020, vol. 9, no. 4, pp. 103–109. (In Russ.)] *doi: 10.33029/2305-3496-2020-9-4-103-109*

17. Трошина Е.А. Роль цитокинов в процессах адаптивной интеграции иммунных и нейроэндокринных реакций организма // Проблемы эндокринологии. 2021. Т. 67, № 2. С. 4–9. [Troshina E.A. The role of cytokines in the processes of adaptive integration of immune and neuroendocrine reactions of the human body. *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology, 2021, vol. 67, no. 2, pp. 4–9. (In Russ.)*] *doi: 10.14341/probl12744*
18. Устьянцева И.М., Кулагина Е.А., Алиев А.Р., Агаджанян В.В. Взаимосвязь расширенных параметров воспаления гематологического анализа (NEUT-RI, NEUT-GI, RE-LYMP, AS-LYMP) с риском развития инфекции при политравме // Политравма. 2019. № 3. С. 6–15. [Ustyantseva I.M., Kulagina E.A., Aliev A.R., Agadzhanyan V.V. Relationship between extended inflammatory parameters of hematologic analysis (NEUT-RI, NEUT-GI, RE-LYMP, AS-LYMP) with risk of infection in polytrauma. *Politravma = Polytrauma, 2019, no. 3, pp. 6–15. (In Russ.)*]
19. Фрейдлин И.С. Современные представления о фагоцитарной теории // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2008. № 5. С. 4–10. [Freidlin I.S. Update views on the theory of phagocytosis. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 2008, no. 5, pp. 4–10. (In Russ.)*]
20. Шарифуллина Л.Д., Мурзабаева Р.Т., Гареев Е.М. Иммунологические особенности воспалительного процесса в остром периоде иксодовых клещевых боррелиозов // Медицинский вестник Башкортостана. 2017. Т. 12, № 5. С. 69–74. [Sharifullina L.D., Murzabaeva R.T., Gareev E.M. Immunological peculiarities of the inflammatory process in the acute period of ixodic tick-borne borreliosis. *Meditsinskii vestnik Bashkortostana = Bashkortostan Medical Journal, 2017, vol. 12, no. 5, pp. 69–74. (In Russ.)*]
21. Gudowska-Sawczuk M., Mroczko B. Selected biomarkers of tick-borne encephalitis: a review. *Int. J. Mol. Sci., 2021, vol. 22, no. 19: 10615. doi:10.3390/ijms221910615*
22. Henriot I., Launay E., Boubaya M., Cremet L., Illiaquer M., Caillon H., Desjonquères A., Gillet B., Béné M.C., Eveillard M. New parameters on the hematology analyzer XN-10 (SysmexTM) allow to distinguish childhood bacterial and viral infections. *Int. J. Lab. Hematol., 2017, vol. 39, no. 1, pp. 14–20. doi: 10.1111/ijlh.12562*
23. Park S.H., Park C.J., Lee B.R., Nam K.S., Kim M.J., Han M.Y., Kim Y.J., Cho Y.U., Jang S. Sepsis affects most routine and cell population data (CPD) obtained using the Sysmex XN-2000 blood cell analyzer: neutrophil-related CPD NE-SFL and NE-WY provide useful information for detecting sepsis. *Int. J. Lab. Hematol., 2015, vol. 37, no. 2, pp. 190–198. doi:10.1111/ijlh.12261*
24. Prodjosoewojo S., Riswari S.F., Djauhari H., Kosasih H., van Pelt L.J., Alisjahbana B., van der Ven A.J., de Mast Q. A novel diagnostic algorithm equipped on an automated hematology analyzer to differentiate between common causes of febrile illness in Southeast Asia. *PLoS Negl. Trop. Dis., 2019, vol. 13, no. 3: e0007183. doi: 10.1371/journal.pntd.0007183*
25. Tokarska-Rodak M., Pańczuk A., Fota-Markowska H., Matuska K. Analysis of selected serological parameters in patients with diagnosed Lyme borreliosis and in seropositive patients with no clinical symptoms. *Ann. Agric. Environ. Med., 2021, vol. 28, no. 3, pp. 397–403. doi:10.26444/aaem/124088*
26. Urrechaga E., Boveda O., Aguirre U. Improvement in detecting sepsis using leukocyte cell population data (CPD). *Clin. Chem. Lab. Med., 2019, vol. 57, no. 6, pp. 918–926. doi:10.1515/cclm-2018-0979*

Авторы:

Воронкова О.В., д.м.н., доцент, зав. кафедрой биологии и генетики ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия;
Ильинских Е.Н., д.м.н., доцент, профессор кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия;
Хасанова Р.Р., к.м.н., доцент кафедры биологии и генетики ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия;
Есимова И.Е., д.м.н., доцент кафедры биологии и генетики ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия;
Семенов А.Г., старший преподаватель кафедры биологии и генетики ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия;
Карпова М.Р., д.м.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия;
Мотлохова Е.А., студент ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия;
Чернышов Н.А., студент ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия;
Ямпольская О.В., студент ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия;
Ямпольская А.В., студент ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, Россия.

Authors:

Voronkova O.V., DSc (Medicine), Associate Professor, Head of the Division of Biology and Genetics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation;
Ilyinskikh E.N., DSc (Medicine), Associate Professor, Professor of the Division of Infectious Diseases and Epidemiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation;
Hasanova R.R., PhD (Medicine), Associate Professor of the Division of Biology and Genetics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation;
Esimova I.E., DSc (Medicine), Associate Professor of the Division of Biology and Genetics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation;
Semenov A.G., Senior Lecturer, Division of Biology and Genetics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation;
Karpova M.R., DSc (Medicine), Professor, Head of the Division of Microbiology and Virology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation;
Motlokhova E.A., Student, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation;
Chernyshov N.A., Student, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation;
Yampolskaya O.V., Student, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation;
Yampolskaya A.V., Student, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 15.02.2023
Принята к печати 25.02.2023

Received 15.02.2023
Accepted 25.02.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 2, pp. 347–354

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 2, с. 347–354

ЧАСТОТА КОЛОНИЗАЦИИ РОТОГЛОТКИ И РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К АЗОЛАМ ГРИБОВ *CANDIDA* spp., ВЫДЕЛЕННЫХ У РЕАНИМАЦИОННЫХ ПАЦИЕНТОВ С COVID-19

С.А. Лисовская[1,2,3], Г.Ш. Исаева[1,2], И.В. Николаева[2], С.Е. Гусева[4], Л.Р. Гайнатуллина[4], Н.С. Чумарев[2]

[1] *ФБУН Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Казань, Россия*
[2] *ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, г. Казань, Россия*
[3] *ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия*
[4] *ГАУЗ Республиканская клиническая инфекционная больница имени профессора А.Ф. Агафонова МЗ РТ, г. Казань, Россия*

Резюме. Пациенты с COVID-19 восприимчивы к развитию кандидоза ротоглотки и инвазивного кандидоза. Инвазивные грибковые инфекции могут осложнять клиническое течение COVID-19 и связаны со значительным ростом смертности. Важным условием успешного лечения кандидоза является определение чувствительности клинических изолятов грибов к антимикотикам. Проведено микробиологическое исследование мазков из ротоглотки у 54 пациентов в возрасте от 33 до 94 лет (средний возраст — 67,4 лет) с тяжелой и крайне тяжелой формой COVID-19, получавших лечение в отделении реанимации и интенсивной терапии на высоте клинических проявлений. Большинство пациентов (95%) имели коморбидную патологию: гипертоническая болезнь (68,5%), сахарный диабет (24%), ИБС (22,2%), хроническая сердечная недостаточность (38,9%), ожирение (23,8%), нарушение ритма сердца (20,4%), хроническая ишемия головного мозга (56,1%), варикозная болезнь вен нижних конечностей (5,5%), хроническая болезнь почек (20,4%), цирроз печени (5,5%), ВИЧ-инфекция (5,5%). Сравнительный анализ микробного биоценоза слизистой ротоглотки показал отличия в частоте встречаемости условно-патогенных видов микроорганизмов, а также в количестве участников микробных ассоциаций. Поливидовые грибково-бактериальные ассоциации встречались чаще и доминировали над поливидовыми бактериальными ассоциациями. По результатам проведенного исследования установлена высокая частота колонизации ротоглотки пациентов с тяжелой формой COVID-19 штаммами грибов рода *Candida*. Подавляющее большинство штаммов грибов рода *Candida* (85,2%) оказались резистентными к антимикотикам группы азолов. Среди кандид доминировали *C. albicans* — выделена у 37 (68,5%) пациентов, *C. parapsilosis* — у 6 (11,1%), *C. tropicalis* — у 3 (5,5%), *C. krusei* — у 2 (3,7%), *C. kefyr* — у 1 (1,9%), *C. glabrata* — у 1 (1,9%) пациента. У 11 (20,4%) пациентов выделены ассоциации *C. albicans* и других видов *Candida*. Концентрация грибов в материале была этиологически значимой (> 10^4–10^5 КОЕ/тамп.) у 80% пациентов. Преобладающее боль-

Адрес для переписки:
Лисовская Светлана Анатольевна
420015, Россия, г. Казань, ул. Большая Красная, 67,
ФБУН Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора.
Тел.: 8 917 299-28-92.
E-mail: S_Lisovskaya@mail.ru

Contacts:
Svetlana A. Lisovskaya
420015, Russian Federation, Kazan, Bolshaya Krasnaya str., 67,
Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology.
Тел.: +7 917 299-28-92.
E-mail: S_Lisovskaya@mail.ru

Для цитирования:
Лисовская С.А., Исаева Г.Ш., Николаева И.В., Гусева С.Е., Гайнатуллина Л.Р., Чумарев Н.С. Частота колонизации ротоглотки и резистентность к азолам грибов Candida spp., выделенных у реанимационных пациентов с COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 2. С. 347–354. doi: 10.15789/2220-7619-CAA-2059

Citation:
Lisovskaya S.A., Isaeva G.Sh., Nikolaeva I.V., Guseva S.E., Gainatullina L.R., Chumarev N.S. Colonization and azole resistance of oropharyngeal Candida fungi in intensive care patients with COVID-19 // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 2, pp. 347–354. doi: 10.15789/2220-7619-CAA-2059

Работа выполнена в рамках программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (Приоритет-2030) и при поддержке гранта РНФ (проект № 20-64-47014).

This work was carried out within the framework of the Strategic Academic Leadership Program of Kazan Federal University (Priority 2030) and supported by a grant from the Russian Science Foundation (Project No. 20-64-47014).

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-CAA-2059

шинство штаммов (более 70%) были резистентны к флуконазолу и вориконазолу, что следует учитывать при назначении терапии кандидоза у больных COVID-19. МИК для флуконазола к штаммам *C. albicans* составила для 4 изолятов > 1024 мкг/мл, для 7 изолятов 512 мкг/мл и для 15 — 128 мкг/мл. Максимальное значение МИК вориконазола в отношении *C. albicans* составило 256 мкг/мл.

Ключевые слова: *COVID-19, SARS-CoV-2, грибы, Candida, резистентность, антимикотики.*

COLONIZATION AND AZOLE RESISTANCE OF OROPHARYNGEAL *CANDIDA* FUNGI IN INTENSIVE CARE PATIENTS WITH COVID-19

Lisovskaya S.A.[a,b,c], Isaeva G.Sh.[a,b], Nikolaeva I.V.[b], Guseva S.E.[d], Gainatullina L.R.[d], Chumarev N.S.[b]

[a] *Kazan Scientifc Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russian Federation*
[b] *Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation*
[c] *Kazan Federal University, Kazan, Russian Federation*
[d] *Republican Clinical Infectious Diseases Hospital (RCIDH), Kazan, Russian Federation*

Abstract. Patients with COVID-19 are susceptible to developing oropharyngeal candidiasis and invasive candidiasis. Invasive fungal infections can complicate the clinical course of COVID-19 and are associated with a substantially increased mortality. An important reason for the successful treatment of candidiasis is to determine the sensitivity of clinical fungal isolates to antimycotics. A microbiological study of oropharyngeal swabs was performed in 54 patients aged 33 to 94 years (mean age 67.4 years) with severe and extremely severe COVID-19, who were treated in the intensive care unit at the height of clinical manifestations. Most patients (95%) had comorbidities: hypertension (68.5%), diabetes mellitus (24%), coronary artery disease (22.2%), chronic heart failure (38.9%), obesity (23.8%), cardiac arrhythmias (20.4%), chronic cerebral ischemia (56.1%), varicose veins of the lower extremities (5.5%), chronic kidney disease (20.4%), liver cirrhosis (5.5%), HIV infection (5.5%). A comparative analysis of oropharyngeal microbial biocenosis showed differences in the frequency of occurrence of opportunistic microbial species, as well as in the number of members in microbial associations. Polyspecific fungal-bacterial associations were more common and dominated polyspecific bacterial associations. According to the results, a high frequency of oropharyngeal colonization in patients with severe COVID-19 by strains of fungi of the genus *Candida* was established. The vast majority of strains of fungi of the genus *Candida* (85.2%) were resistant to antimycotics of the azole group. A high frequency (85.2%) of oropharyngeal colonization in resuscitation patients with azole-resistant strains of fungi of the genus *Candida* was revealed. *C. albicans* dominated among *Candida*. *C. albicans* was isolated in 37 (68.5%) patients, *C. pararapsilosis* — in 6 (11.1%), *C. tropicalis* — in 3 (5.5%), *C. krusei* — in 2 (3.7%)%), *C. kefyr* — in 1 (1.9%), *C. glabrata* — in 1 (1.9%) patient. In 11 (20.4%) patients, associations of *C. albicans* and other *Candida* species were identified. The level of fungi in the material was etiologically significant (> 10^4–10^5 CFU/tamp.) in 80% of patients. The vast majority of strains (more than 70%) were resistant to fluconazole and voriconazole, which should be taken into account when prescribing candidiasis therapy in patients with COVID-19. The MIC for fluconazole against *C. albicans* strains was > 1024 μg/ml for 4 isolates, 512 μg/ml for 7 isolates, and 128 μg/ml for 15 isolates. The maximum MIC values for voriconazole against *C. albicans* was 256 μg/ml.

Key words: *COVID-19, SARS-CoV-2, fungi, Candida, resistance, antimycotics.*

Введение

Коронавирус SARS-CoV-2 — причина текущей пандемии респираторной инфекции с частым развитием вирусной пневмонии и полиорганных нарушений. По данным Всемирной организации здравоохранения, во всем мире за время пандемии зарегистрировано более 574 млн заражений COVID-19, в том числе более 14 млн смертей. Высокая смертность от COVID-19 связана не только с обширным вирусным повреждением легких, но и присоединением вторичных бактериальных или грибковых инфекции [17]. На сегодняшний день недостаточно информации об оппортунистических грибковых инфекциях, развивающихся у пациентов с COVID-19, и связанным с ними осложнениями [8, 19, 20]. Для пациентов с COVID-19 актуальными являются аспергиллез, инвазивный кандидоз и мукормикоз [12]. Инвазивные грибковые инфекции могут осложнять клиническое течение COVID-19 и связаны со значительным ростом смертности, особенно у тяжелобольных пациентов, поступивших в отделение интенсивной терапии (ОИТ) [10]. Пациенты, госпитализированные с COVID-19, подвержены риску развития внутрибольничных инфекций, включая кандидемию [14].

Многие факторы могут быть связаны с развитием грибковых суперинфекций, включая вирусную иммуносупрессию, повреждение эпителия дыхательных путей, использование антибиотиков, стероидов, антицитокиновых препаратов, искусственную вентиляцию легких и длительное пребывание в отделениях интенсивной терапии и реанимации [10, 19].

Доказано, что колонизация дыхательных путей грибами у пациентов, находящихся на искусственной вентиляции легких, связана с большей длительностью пребывания пациента в отделении реанимации, повышенным риском развития ИВЛ-ассоциированной пневмонии, и более высокой смертностью [11, 13, 15].

В настоящее время серьезной проблемой является рост устойчивости клинических штаммов грибов к антимикотикам, что может быть причиной неэффективности проводимой эмпирической терапии микозов, особенно во внутрибольничных условиях. Согласно данным литературы, механизм формирования резистентности грибов рода *Candida* к азолам может быть связан с генетическими мутациями самого микроорганизма, а также способностью *Candida* spp. к образованию биопленок. В механизме устойчивости к антимикотическим препаратам важную роль играет мутантный ген ERG11, который считают маркером резистентности *Candida* spp. и идентифицируют на практике методами ПЦР и ПЦР-РВ [2].

Целью нашей работы было изучение состава микрофлоры и определение чувствительности к антимикотикам группы азолов (флуконазол и вориконазол) грибов рода *Candida*, выделенных из ротоглотки у пациентов с тяжелой формой COVID-19.

Материалы и методы

Объектами исследования были пациенты с тяжелой и крайне тяжелой формой COVID-19, получавшие лечение в реанимационном отделении Республиканской клинической инфекционной больнице г. Казани с декабря 2020 по апрель 2021 г. У всех пациентов диагноз COVID-19 был подтвержден положительным результатам ПЦР-теста на РНК SARS-CoV-2 в мазках со слизистой носа и ротоглотки. Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с этическими нормами Хельсинкской Декларации 2011 г.

На каждого пациента заполнялась индивидуальная регистрационная карта, включающая жалобы, анамнез заболевания, данные объективного осмотра, данные иммунологического и микробиологического исследований. Обследовано 39 пациентов в возрасте от 33 до 94 лет. Средний возраст пациентов составил — 67,4 лет. Пациентов в возрасте до 60 лет было 9 (23,1%), ≥ 60 лет — 30 человек (76,9%). Среди обследованных женщин было 24 (61,5%), мужчин — 25 (38,5%). Большинство пациентов (95%) имели коморбидную патологию: гипертоническая болезнь (68,5%), сахарный диабет (24%), ИБС (22,2%), хроническая сердечная недостаточность (38,9%), ожирение (23,8%), нарушение ритма сердца (20,4%), хроническая ишемия головного мозга (56,1%), варикозная болезнь вен нижних конечностей (5,5%), хроническая болезнь почек (20,4%), цирроз печени (5,5%), ВИЧ-инфекция (5,5%)

По результатам проведения РКТ органов грудной клетки вирусная пневмония с объемом поражения легких КТ-1 диагностирована у (5,6%), КТ-2 — (22,3%), КТ-3 — (33,4%), КТ-4 — у пациентов (30,6%), у 14,5% пациентов диагностирована вирусно-бактериальная пневмония.

В кислородной поддержке нуждались 94,7% пациентов, из них на НИВЛ находились 83,9%, на ИВЛ — 6,8%.

Антибиотики на догоспитальном этапе принимали 23,5% пациентов. В стационаре все пациенты получали антибиотики и глюкокортикостероиды (дексаметазон, преднизолон, метипред). Большинство пациентов (61,9%) получали антицитокиновые препараты (олокизумаб, левилимаб, тоцилизумаб, сарилумаб, барицитиниб), 11,2% пациентам проводилось переливание антиковидной плазмы. Летальный исход наступил у 63,2% пациентов Основными причинами смерти являлись: острый респираторный дистресс синдром, острая сердечно-сосудистая недостаточность, ТЭЛА и синдром полиорганной недостаточности.

Взятие материала осуществляли до назначения антимикотиков стерильными ватными тампонами со слизистой зева. Тампон помещали в транспортную среду и в течение 2 ч доставляли в микологическую лабораторию. Микологическое исследование проводили на базе «Казанского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (КНИИЭМ). Микроскопические грибы идентифицировали общепризнанными микроскопическими, биохимическими методами. В работе использовали селективные хромогенные среды (Bio-Rad, США) и коммерческие тест-системы, основанные на исследовании ауксанограммы, — «Auxacolor 2» (Bio-Rad, США).

Определение чувствительности штаммов *Candida* spp. к препаратам *in vitro* выполняли по протоколу CLSI M27-A3 методом определения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) с помощью метода разведения в жидкой питательной среде. В исследовании использовали сухую питательную среду RPMI 1640 с 0,2% глюкозы без бикарбоната (Sigma-Aldrich, США) [7]. Субстанции антимикотиков: флуконазол и вориконазол (Hetero Drugs Limited, Индия) растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Последующее разведение антимикотиков проводили в RPMI1640 в 96-луноч-

ных U-образных планшетах в концентрациях от 1000 до 0,9 мкг/мл.

Для приготовления взвесей *Candida* spp. культуры выращивали в течение 1–2 суток при 30°С и 37°С на агаре Сабуро. Затем клеточную массу снимали с поверхности агара бактериологической петлей, суспендировали в пробирке с 0,85% стерильным раствором натрия хлорида до густоты рабочих взвесей 0,5 КД по МакФарланду. Готовые взвеси разводили в 0,85% стерильном растворе натрия хлорида с дальнейшим разведением в RPMI 1640 до концентрации 10^3 клеток/мл. В каждую лунку вносили 0,1 мл рабочей взвеси. Для каждой культуры ставили следующие контроли: питательной среды (среда без культуры и без препарата), культуры (питательная среда с культурой без препарата) и качества исследования с использованием тест-культуры *C. albicans* ATCC 10231. Засеянные планшеты инкубировали при 37°С в течение 48 часов. Определение МИК осуществляли визуально. За МИК принимали минимальную концентрацию исследуемых соединений, обеспечивающую полное подавление видимого роста исследуемых штаммов микроорганизмов.

Согласно критериям интерпретации метода M27-A3 МИК чувствительных к флуконазолу штаммов < 8 мкг/мл, умеренно чувствительных — 16–32 мкг/мл, устойчивых > 64 мкг/мл; МИК чувствительных к вориконазолу штаммов — < 1 мкг/мл, умеренно чувствительных — 2 мкг/мл, устойчивых — > 4 мкг/мл [7].

Полученные в процессе исследования результаты различия между показателями микроорганизмов, выделенных из ротоглотки двух возрастных групп, обрабатывали с помощью программной системы STATISTICA for Windows ver. 6.0. Критерием статистической достоверности получаемых данных считали общепринятую в медицине величину $p < 0,05$.

Результаты

По результатам исследования выявлено, что микробный пейзаж ротоглотки у больных COVID-19 был представлен полимикробной флорой, состоящей из условно-патогенных бактерий и микроскопических грибов. Бактериальная микрофлора преобладала среди выделенных культур микроорганизмов у пациентов всех возрастных групп. Среди грамположительных видов доминировали *Enterococcus faecalis* (21,8%), *Streptococcus pneumoniae* (59,9%), *Staphylococcus haemolyticus* (35,9%), *Staphylococcus aureus* (15,9%), среди грамотрицательных микробов — *Acinetobacter baumannii* (15,9%), *Serratia marcescens* (5,9%), *Pseudomonas aeruginosa* (5,9%), *Klebsiella pneumoniae* (15,9%) (рис. 1).

Грибы рода *Candida* выделены у 35 (89,7%) пациентов. Среди кандид доминировали *C. albicans*, которые обнаружены у 30 (85,7%) пациентов. *C. pararapsilosis* выделена у 9 (25,7%), *C. tropicalis* — у 1 (2,8%), *C. krusei* — у 1 (2,8%), *C. kefyr* — у 1 (2,8%), *C. glabrata* — у 1(2,8%) пациента (рис. 2) ($p < 0,05$).

У 11 (20,4%) пациентов выделены ассоциации *C. albicans* и других видов *Candida*. Концентрация грибов в материале составила 10^2–10^5 КОЕ/мл, однако у большинства пациентов (81%), грибы выделены из ротоглотки в этиологически значимых количествах (> 10^4–10^5 КОЕ/тамп.) ($p < 0,05$).

Сравнительный анализ микробного биоценоза слизистой ротоглотки показал отличия в частоте встречаемости условно-патогенных видов микроорганизмов, а также в количестве участников микробных ассоциаций. Выявлены микробные ассоциации характерные для больных с тяжелой и крайне-тяжелой формой COVID-19 (рис. 3), где поливидовые грибково-бактериальные ассоциации встречались достоверно чаще и доминировали над поливи-

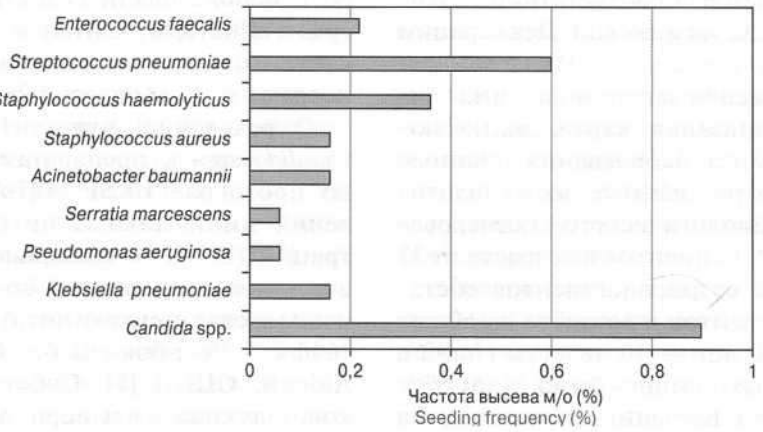


Рисунок 1. Видовой состав микробного пейзажа ротоглотки у больных COVID-19

Figure 1. Species composition of oropharyngeal microbial landscape in patients with COVID-19

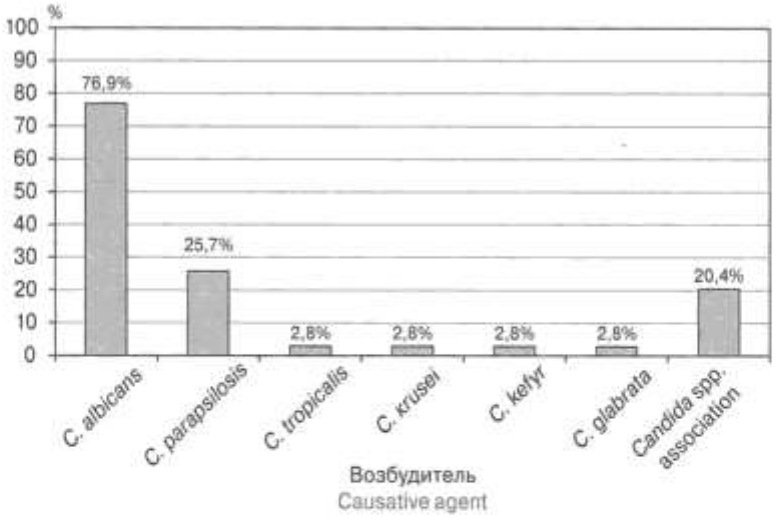


Рисунок 2. Частота выделения различных видов грибов рода *Candida* из ротоглотки у пациентов с тяжелой и крайне тяжелой формой COVID-19

Figure 2. The frequency of oropharyngeal isolation of various types of *Candida* fungi in patients with severe and extremely severe COVID-19

довыми бактериальными ассоциациями ($p < 0,05$). Причем в группе пациентов старше 60 лет ассоциации в отсутствии микроскопических грибов встречались в два раза реже (9,7%), чем в группе < 60 лет (20,0%).

На сегодняшний день существует несколько классов антимикотиков для лечения инфекций, вызванных грибами рода *Candida*. Полиены, азолы, эхинокандины, аналоги нуклеозидов и аллиламины используются с различной эффективностью в зависимости от клинической формы и локализации грибковой инфекции и чувствительности клинического изолята гриба. Азоловые антимикотики (флуконазол, вориконазол) являются основными препаратами для лечения инвазивного кандидоза.

По результатам оценки чувствительности клинических изолятов грибов к антимикотическим препаратам выявлено, что более 70% штаммов грибов *Candida* spp., выделенных от пациентов с тяжелой и крайне тяжелой формами COVID-19, были резистентны к флуконазолу и вориконазолу (табл.). Выявлено, что МИК для флуконазола к штаммам *C. albicans* составила: для 3 изолятов — 1024 мкг/мл, для 7 изолятов — 512 мкг/мл и для 11 изолятов — 128 мкг/мл. Таким образом, 21 (70,0%) штамм *C. albicans* был резистентен к флуконазолу. К вориконазолу были резистентны 32 (86,6%) штамма *C. albicans*. Максимальное значение МИК вориконазола в отношении *C. albicans* составило 256 мкг/мл. Штамм *C. glabrata* (n = 1) был чувствительным к флуконазолу и вориконазолу. Штаммы *C. kefyr* (n = 1) и *C. krusei* (n = 1) были устойчивы к флуконазолу и чувствительны к вориконазолу. Один штамм *C. pararapsilosis* (11,1%) был чувствительным к флуконазолу и 2 штамма *C. pararapsilosis* (22,2%) — к вориконазолу. Штамм *C. tropicalis* (n = 1) был устойчив к вориконазолу и флуконазолу.

Обсуждение

В условиях пандемии новой коронавирусной инфекции COVID-19 отмечается рост числа микозов, что может быть связано с иммуносупрессивным действием SARS-CoV-2, широким

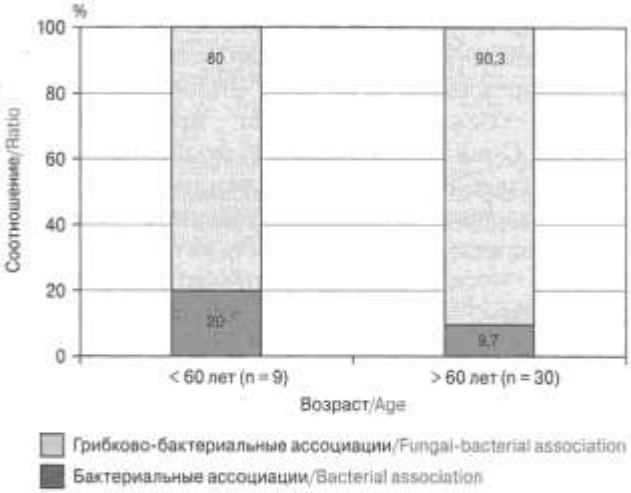


Рисунок 3. Частота встречаемости бактериальных и бактериально-грибковых ассоциаций, выделенных от пациентов с тяжелой и крайне тяжелой формой COVID-19 в разных возрастных группах

Figure 3. Age-related frequency of occurrence of bacterial and bacterial-fungal associations isolated from patients with severe and extremely severe COVID-19

Таблица. Определение МИК флуконазола и вориконазола в отношении штаммов *Candida* spp.
Table. Determination of MIC of fluconazole and voriconazole in relation to *Candida* spp. strains

Вид *Candida* *Candida* species	**Антимикотик** Antimycotic	**Количество штаммов *Candida* чувствительных к антимикотикам при различных показателях МИК** The number of *Candida* strains sensitive to antimycotics at different MICs										
		МИК (мкг/мл)/MIC (μg/ml)										
		1	**2**	**4**	**8**	**16**	**32**	**64**	**128**	**256**	**512**	**1024**
***C. albicans* (n = 30)**	**Флуконазол** Fluconazole	–	–	–	4	–	5	–	11	–	7	3
	Вориконазол Voriconazole	–	5	1	6	–	–	8	–	10	–	–
***C. parapsilosis* (n = 9)**	**Флуконазол** Fluconazole	–	–	–	–	–	1	3	4	1	–	–
	Вориконазол Voriconazole	–	2	–	3	–	4	–	–	–	–	–
***C. tropicalis* (n = 1)**	**Флуконазол** Fluconazole	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–
	Вориконазол Voriconazole	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–
***C. krusei* (n = 1)**	**Флуконазол** Fluconazole	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1
	Вориконазол Voriconazole	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–
***C. kefyr* (n = 1)**	**Флуконазол** Fluconazole	–	–	–	–	–	–	–	–	1	–	–
	Вориконазол Voriconazole	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–
***C. glabrata* (n = 1)**	**Флуконазол** Fluconazole	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–
	Вориконазол Voriconazole	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–

применением антибиотиков, глюкокортикостероидов (ГКС) и антицитокиновых препаратов у пациентов с тяжелой формой инфекции [9, 18]. Повреждение эпителия, вызванное SARS-CoV-2, также способствует прикреплению грибов *Candida* к базальной мембране, вызывая в дальнейшем развитие кандидоза слизистых оболочек. Факторы патогенности самого гриба играют ведущую роль в патогенезе кандидоза, поскольку способны противостоять иммунным защитным механизмам хозяина и действию противомикробных препаратов [6]. Преобладающее большинство пациентов с тяжелой формой COVID-19 составляют пожилые люди, имеющие коморбидную патологию (ожирение, сахарный диабет и др.), что также повышает риск развития микозов. Неблагоприятной тенденцией в настоящее время является рост устойчивости грибов к антифунгальным препаратам, что является серьезной клинической проблемой [17]. Исследователи акцентируют внимание на росте числа случаев летальных исходов от кандидозов в связи с поздним началом адекватной противогрибковой терапии [16]. Известно, что колонизация слизистых грибами рода *Candida* является независимым фактором риска развития инвазивного кандидоза у пациентов ОРИТ [3, 4, 5].

В нашем исследовании мы изучили состав микрофлоры ротоглотки у 39 пациентов ОРИТ с тяжелой формой COVID-19, среди которых преобладали пожилые люди (75,9%) с коморбидной патологией (метаболическими заболеваниями, болезнями сердечно-сосудистой системы, почек и печени), получавшие антибиотики, ГКС. Большинство пациентов (61,9%) получили антицитокиновые препараты, вызывающие иммуносупрессию.

По результатам исследования выделены различные условно-патогенные бактерии (*E. faecalis, S. pneumoniae, S. aureus, A. baumannii, P. aeruginosa, K. pneumoniae* и др.), которые доминировали в микробиоценозе ротоглотки и представляли угрозу в плане развития бактериальных суперинфекций. Подавляющее большинство 89,7% пациентов ОРИТ были колонизированы микроскопическими дрожжевыми грибами рода *Candida*. *C. albicans* занимали лидирующее место среди других видов грибов и обнаруживались не только в монокультуре, но и в ассоциации с другими видами *Candida* spp. *Candida non-albicans* были представлены следую-

щими видами: *C. pararapsilosis, C. tropicalis, C. krusei, C. glabrata, C. kefyr.* Исследование показало, что в большинстве случаев грибы высевались в этиологически значимых количествах, что повышает риск развития поверхностного и инвазивного кандидоза у данных пациентов.

В ходе исследования нами было проведено определение чувствительности штаммов *Candida* spp. к препаратам азолового ряда (флуконазол и вориконазол), которые широко применяются в клинике для эмпирического лечения кандидоза. Ранее отечественными учеными проводились масштабные исследования по изучению чувствительности к антимикотикам клинических штаммов *Candida* spp. у пациентов с инвазивным кандидозом, и выявлено, что 78,3% штаммов кандид были чувствительны к флуконазолу и 86,9% — к вориконазолу [2]. Исследование, проведенное Ароновой Н.В. и др. (2021) в период пандемии COVID-19, выявило высокую частоту устойчивости *C. albicans*, выделенных у пациентов с коронавирусной инфекцией, к флуконазолу (80%) [1]. В нашем исследовании к флуконазолу были резистентны 70,0% штаммов *C. albicans* и 84,6% штаммов *Candida non-albicans*; к вориконазолу — 80,0% штаммов *C. albicans* и 69,2% штаммов *Candida non-albicans.*

Таким образом, по результатам проведенного исследования установлена высокая частота колонизации ротоглотки пациентов с тяжелой формой COVID-19 штаммами грибов рода *Candida,* устойчивыми к азолам, в связи с чем необходимо тестировать чувствительность выделенных штаммов грибов к антимикотикам. Эмпирическая терапия кандидоза, развившегося у пациентов с COVID-19, препаратами из группы азолов с высокой степенью вероятности будет неэффективной.

Список литературы/References

1. Аронова Н.В., Павлович Н.В., Цимбалистова М.В., Полеева М.В., Анисимова А.С., Водопьянов С.О., Носков А.К. Видовое разнообразие и маркеры резистентности дрожжей рода Candida у коронапозитивных и коронанегативных больных с внебольничными пневмониями // Антибиотики и химиотерапия. 2021. Т. 66, № 7–8. С. 38–44. [Aronova N.V., Pavlovich N.V., Tsymbalistova M.V., Poleeva M.V., Anisimova A.S., Vodopyanov S.O., Noskov A.K. Species diversity and resistance markers of candida yeasts in COVID positive and COVID negative patients with community-acquired pneumonia. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy. 2021, vol. 66, no. 7–8, pp. 38–44. (In Russ.)*] *doi: 10.37489/0235-2990-2021-66-7-8-38-44*
2. Беженар М.Б., Плахова К.И. Механизмы развития резистентности к противогрибковым препаратам грибов рода Candida при рецидивирующем течении урогенитального кандидоза // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2020. Т. 38, № 1. С. 15–23. [Bezhenar M.B., Plakhova K.I. Antifungal drug resistance Candida spp. mechanisms in reccurent genital candidiasis. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology, 2020, vol. 38, no. 1, pp. 15–23. (In Russ.)*] *doi: 10.17116/molgen20203801115*
3. Белоцерковский Б.З., Гельфанд Е.Б., Быков А.О., Мамонтова О.А., Проценко Д.Н. Критерии назначения системной антимикотической терапии в хирургическом отделении реанимации и интенсивной терапии (обзор литературы) // Тазовая хирургия и онкология. 2019. Т. 9, № 4. С. 11–20. [Belotserkovskiy B.Z., Gelfand E.B., Bykov A.O., Mamontova O.A., Protsenko D.N. Criteria for the administration of systemic antimicotic therapy in surgical intensive care units (literature review). *Tazovaya khirurgiya i onkologiya = Pelvic Surgery and Oncology, 2019, vol. 9, no. 4, pp. 11–20. (In Russ.)*] *doi: 10.17650/2686-9594-2019-9-4-11-20*
4. Веселов А.В., Климко Н.Н., Кречикова О.И., Клясова Г.А., Агапова Е.Д., Мултых И.Г., Розанова С.М., Крайнова Л.Е., Дмитриева Н.В., Козлов Р.С. In vitro активность флуконазола и вориконазола в отношении более 10000 штаммов дрожжей: результаты 5-летнего проспективного исследования ARTEMIS Disk в России // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2008. Т. 10, № 4. С. 345–354. [Veselov A.V., Klimko N.N., Krechikova O.I., Klyasova G.A., Agapova E.D., Multykh I.G., Rozanova S.M., Krainova L.E., Dmitrieva N.V., Kozlov R.S. In vitro activity of fluconazole and voriconazole against more than 10000 yeast strains: results of a 5-years prospective ARTEMIS disk study in Russia. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy, 2008, vol. 10, no. 4, pp. 345–354. (In Russ.)*]
5. Веселов А.В. Прогностические правила для оценки риска инвазивного кандидоза у пациентов ОРИТ // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2017. Т. 19, № 4. С. 296–302. [Veselov A.V. Prognostic rules for invasive candidiasis risk assessment in ICU patients. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy, 2017, vol. 19, no. 4, pp. 296–302. (In Russ.)*]
6. Назарова Н.М., Гусаков К.И., Павлович С.В., Довлетханова Э.Р. Рецидивирующий вульвовагинальный кандидоз на фоне пандемии COVID-19: алгоритм ведения пациенток // Медицинский Совет. 2021. № 13. С. 177–184. [Nazarova N.M., Gusakov K.I., Pavlovich S.V., Dovletkhanova E.R. Recurrent vulvovaginal candidiasis during COVID-19 pandemic: medical algorithm. *Meditsinskiy sovet = Medical Council, 2021, no. 13, pp. 177–184. (In Russ.)*] *doi: 10.21518/2079-701X-2021-13-177-184*
7. Рауш Е.Р., Выборнова И.В., Шагдилеева Е.В., Васильева Н.В., Богомолова Т.С., Хостелиди С.Н., Климко Н.Н. Определение чувствительности возбудителей инвазивного кандидоза к флуконазолу и вориконазолу по международным стандартам // Проблемы медицинской микологии. 2013. Т. 15, № 1. С. 60–63. [Raush E.R., Vyborrnova I.V., Shagdileeva E.V., Vasilyeva N.V., Bogomolova T.S., Khostelidi S.N., Klimko N.N. Susceptibility testing of invasive candidosis pathogens to Fluconazole and Voriconazole by international standards. *Problemy meditsinskoi mikologii = Problems of Medical Mycology, 2013, vol. 15, no. 1, pp. 60–63. (In Russ.)*]

8. Akpan A., Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad. Med. J., 2002, vol. 78, no. 922, pp. 455–459. doi: 10.1136/pmj.78.922.455*
9. Bertolini M., Ranjan A., Thompson A., Diaz P.I., Sobue T., Maas K., Dongari-Bagtzoglou A. Candida albicans induces mucosal bacterial dysbiosis that promotes invasive infection. *PLoS Pathog., 2019, vol. 15, no. 4: e1007717. doi: 10.1371/journal.ppat.1007717.10*
10. Casalini G., Giacomelli A., Ridolfo A., Gervasoni C., Antinori S. Invasive fungal infections complicating COVID-19: a narrative review. *J. Fungi, 2021, vol. 7, no. 11: 921. doi: 10.3390/jof7110921*
11. Delisle M.S., Williamson D.R., Albert M., Perreault M.M., Jiang X., Day A.G., Heyland D.K. Impact of Candida species on clinical outcomes in patients with suspected ventilator-associated pneumonia. *Can. Respir. J., 2011, vol. 18, no. 3, pp. 131–136. doi: 10.1155/2011/827692*
12. Gangneux J.P., Bougnoux M.E., Dannaoui E., Cornet M., Zahar J.R. Invasive fungal diseases during COVID-19: we should be prepared. *J. Mycol. Med., 2020, vol. 30, no. 2: e100971. doi: 10.1016/j.mycmed.2020.100971*
13. Jeronimo L.S., Esteves Lima R.P., Suzuki T.Y.U., Discacciati J.A.C., Bhering C.L.B. Oral candidiasis and COVID-19 in users of removable dentures: is special oral care needed? *Gerontology, 2022, vol. 68, no. 1, pp. 80–85. doi: 10.1159/000515214*
14. Nucci M., Barreiros G., Guimarães L.F., Deriquehem V.A., Castiñeiras A.C., Nouér S.A. Increased incidence of candidemia in a tertiary care hospital with the Covid-19 pandemic. *Mycoses, 2021, vol. 64, no. 2, pp. 152–156. doi: 10.1111/myc.13225*
15. Pendleton K.M., Dickson R.P., Newton D.W., Hoffman T.C., Yanik G.A., Huffnagle G.B. Respiratory tract colonization by Candida species portends worse outcomes in immunocompromised patients. *Clin. Pulm. Med., 2018, vol. 25, no. 6, pp. 197–201. doi: 10.1097/CPM.0000000000000279*
16. Pote S.T., Sonawane M.S., Rahi P., Shah S.R., Shouche Y.S., Patole M.S., Thakar M.R., Sharma R. Distribution of pathogenic yeasts in different clinical samples: their identification, antifungal susceptibility pattern, and cell invasion. *Infect. Drug. Resist., 2020, no. 13, pp. 1133–1145. doi: 10.2147/IDR.S238002*
17. Ripa M., Galli L., Poli A., Oltolini C., Spagnuolo V., Mastrangelo A., Muccini C., Monti G., De Luca G., Landoni G., Dagna L., Clementi M., Rovere Querini P., Ciceri F., Tresoldi M., Lazzarin A., Zangrillo A., Scarpellini P., Castagna A.; COVID-BioB study group. Secondary infections in patients hospitalized with COVID-19: incidence and predictive factors. *Clin. Microbiol. Infect., 2021, vol. 27, no. 3, pp. 451–457. doi: 10.1016/j.cmi.2020.10.021*
18. Romo J.A., Kumamoto C.A. On commensalism of Candida. *J. Fungi (Basel), 2020, vol. 6, no. 16. doi: 10.3390/jof6010016*
19. Salehi M., Ahmadikia K., Mahmoudi S., Kalantari S., Jamalimoghadamsiahkali S., Izadi A., Kord M., Dehghan Manshadi S.A., Seifi A., Ghiasvand F., Khajavirad N., Ebrahimi S., Koohfar A., Boekhout T., Khodavaisy S. Oropharyngeal candidiasis in hospitalised COVID-19 patients from Iran: species identification and antifungal susceptibility pattern. *Mycoses, 2020, vol. 63, no. 8, pp. 771–778. doi: 10.1111/myc.13137*
20. Wang B., Zhang L., Wang Y., Dai T., Qin Z., Zhou F., Zhang L. Alterations in microbiota of patients with COVID-19: potential mechanisms and therapeutic interventions. *Sig. Transduct. Target Ther., 2022, vol. 7, no. 143. doi: 10.1038/s41392-022-00986-0*

Авторы:
Лисовская С.А., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории микологии ФБУН Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Казань, Россия; доцент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия; ведущий научный сотрудник лаборатории биологически активных терпеноидов ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия;
Исаева Г.Ш., д.м.н., профессор, зам. директора по инновационному развитию ФБУН Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Казань, Россия; зав. кафедрой микробиологии ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия;
Николаева И.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой инфекционных болезней ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия;
Гусева С.Е., врач-инфекционист ГАУЗ Республиканская клиническая инфекционная больница имени профессора А.Ф. Агафонова МЗ РТ, г. Казань, Россия;
Гайнатуллина Л.Р., врач-инфекционист, зав. отделением ГАУЗ Республиканская клиническая инфекционная больница имени профессора А.Ф. Агафонова МЗ РТ, г. Казань, Россия;
Чумарев Н.С., ассистент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия.

Authors:
Lisovskaya S.A., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Mycology, Kazan Scientifc Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russian Federation; Associate Professor, Department of Microbiology, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation; Leading Researcher, Biologically Active Terpenoids Laboratory, Kazan Federal University, Kazan, Russian Federation;
Isaeva G.Sh., DSc (Medicine), Professor, Deputy Director for Innovation Development, Kazan Scientifc Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russian Federation; Head of the Department of Microbiology, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation;
Nikolaeva I.V., DSc (Medicine), Professor, Head of the Department of Infectious Diseases, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation;
Guseva S.E., Infectious Diseases Physician, Republican Clinical Infectious Diseases Hospital, Kazan, Russian Federation;
Gainatullina L.R., Infectious Diseases Physician, Head of the Department, Republican Clinical Infectious Diseases Hospital, Kazan, Russian Federation;
Chumarev N.S., Assistant Professor, Department of Microbiology, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation.

Поступила в редакцию 01.11.2022
Принята к печати 09.03.2023

Received 01.11.2022
Accepted 09.03.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 2, pp. 355–362

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 2, с. 355–362

ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО И ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА В ПЕРИФЕРИЧЕСКОМ И ЛОКАЛЬНОМ КРОВОТОКАХ У ПАЦИЕНТОК С ПЕРВИЧНЫМ ВАРИКОЗОМ ВЕН МАЛОГО ТАЗА

М.А. Даренская[1], А.А. Семендяев[2], Д.А. Ступин[1,2], С.И. Колесников[1], Н.В. Семенова[1], К.В. Пестерев[2], Колесникова Л.И[1].

[1] ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия
[2] ФГБОУ ВО Иркутский государственный медицинский университет, г. Иркутск, Россия

Резюме. Проблема варикоза вен малого таза (ВВМТ) у женщин крайне актуальна по причине тесной связи с репродуктивными нарушениями и рецидивом заболевания. Несмотря на проводимые исследования в данной области, результаты анализа реактивности иммунных реакций при ВВМТ достаточно противоречивы, и, в основном, касаются общих механизмов. Изучение клеточно-опосредованных и гуморальных компонентов адаптивного иммунитета позволит оценить интенсивность и динамику прогрессирования варикозного изменения вен, а также возможность использования показателей иммунного статуса для оптимизации диагностики и иммунологической коррекции. Целью настоящего исследования явилось изучение особенностей показателей клеточного и гуморального иммунитета в периферическом (локтевая) и локальном (яичниковая) венозных бассейнах у женщин с легкой и среднетяжелой формами ВВМТ. В исследовании приняли участие 142 женщины репродуктивного возраста (средний возраст — 37,2±7,1 лет) с диагнозом ВВМТ легкой (I группа) (n = 79) и среднетяжелой (II группа) (n = 63) формы. В качестве контроля использовались данные 30 практически здоровых женщин (средний возраст 33,5±6,3 года). Для идентификации субпопуляций лимфоцитов использовали метод проточной цитофлюориметрии. Функциональное состояние гуморального звена иммунитета оценивали путем определения концентрации иммуноглобулинов IgA, IgG, IgM методом радиальной иммунодиффузии в геле. Согласно нашим данным, у пациенток I группы изменения были зарегистрированы только в локальном кровотоке — в виде значительной лимфоцитопении (снижение уровня $CD3^+$ и $CD4^+$ лимфоцитов). У пациенток II группы изменения были более выраженными: повышенные значения лимфоцитов, $CD3^+$, $CD4^+/CD8^+$, IgA и более низкие уровни IgM, IgG в периферическом кровотоке; высокое среднее число лейкоцитов, лимфоцитов, IgA и сниженные концентрации $CD3^+$, $CD4^+$, $CD4^+/CD8^+$, IgM и IgG в локальном. Можно заключить, что при легкой степени тяжести ВВМТ, изменения показателей в локальном кровотоке являются первичными и характеризуются нарушениями в клеточном звене иммунитета. С увеличением тяжести заболевания компенсаторные возможности организма снижаются, что проявляется выраженным комбинированным иммунодефицитом на уровне локального кровотока и менее выраженными проявлениями

Адрес для переписки:
Даренская Марина Александровна
664003, Россия, г. Иркутск ул. Тимирязева, 16, ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека.
Тел.: 8 964 227-52-72 (моб.).
E-mail: marina_darenskaya@inbox.ru

Contacts:
Marina A. Darenskaya
664003, Russian Federation, Irkutsk, Timiryaseva str., 16, Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems.
Phone: +7 964 227-52-72 (mobile).
E-mail: marina_darenskaya@inbox.ru

Для цитирования:
Даренская М.А., Семендяев А.А., Ступин Д.А., Колесников С.И., Семенова Н.В., Пестерев К.В., Колесникова Л.И. Показатели клеточного и гуморального иммунитета в периферическом и локальном кровотоках у пациенток с первичным варикозом вен малого таза // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 2. С. 355–362. doi: 10.15789/2220-7619-CAH-2108

Citation:
Darenskaya M.A., Semendyaev A.A., Stupin D.A., Kolesnikov S.I., Semenova N.V., Pesterev K.V., Kolesnikova L.I. Cellular and humoral immune parameters in the peripheral and local blood flow in patients with primary pelvic varicose // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 2, pp. 355–362. doi: 10.15789/2220-7619-CAH-2108

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-CAH-2108

на уровне периферии. Данные результаты могут способствовать более точной оценке интенсивности и динамики прогрессирования варикозного изменения вен малого таза с целью оптимизации диагностики и иммунологической коррекции.

Ключевые слова: *варикоз вен малого таза, женщины, иммунитет, иммуноглобулины, локальный кровоток, системный кровоток, яичниковые вены.*

CELLULAR AND HUMORAL IMMUNE PARAMETERS IN THE PERIPHERAL AND LOCAL BLOOD FLOW IN PATIENTS WITH PRIMARY PELVIC VARICOSE

Darenskaya M.A.[a], Semendyaev A.A.[b], Stupin D.A.[a,b], Kolesnikov S.I.[a], Semenova N.V.[a], Pesterev K.V.[b], Kolesnikova L.I.[a]

[a] *Scientific Centre of the Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation*
[b] *Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russian Federation*

Abstract. Pelvic varicose veins (PVV) in women is of extremely high relevance due to a close relationship with reproductive disorders and disease relapse. Despite on research in the field, the results of the analysis on immune reactivity in PVV are rather contradictory, and mainly relate to general mechanisms. The study of cell-mediated and humoral arms of adaptive immunity will allow us to assess an intensity and dynamics of PVV progression as well as a potential for using immune status parameters to optimize diagnosis and immunological correction. The aim of this study was to assess characteristics of cellular and humoral immunity in peripheral (ulnar) and local (ovarian) venous pools in women with mild and moderate PVV. The study involved 142 women of reproductive age (mean age — 37.2±7.1 years) with diagnosed PVV — mild (Group 1) (n = 79) and moderate (Group 2) (n = 63) forms. Data from 30 apparently healthy women (mean age 33.5±6.3 years) were in control group. Flow cytometry was used to identify lymphocyte subsets. The functional state of the humoral immunity was assessed by measuring concentration of immunoglobulins IgA, IgG, IgM by using radial immunodiffusion in the gel. According to our data obtained, patients in group 1 had changes found only in the local blood flow such as prominent lymphocytopenia (decreased level of $CD3^+$ and $CD4^+$ lymphocytes). Patients in group 2 were featured with more pronounced changes: increased lymphocyte level, $CD3^+$, $CD4^+/CD8^+$, IgA and lower levels of IgM, IgG in peripheral blood; high average leukocyte and lymphocyte count, IgA and reduced levels of $CD3^+$, $CD4^+$, $CD4^+/CD8^+$, IgM and IgG in the local area. It can be concluded that altered parameters in the local blood flow are of primary origin in mild PVV being characterized by disturbed cellular immune arm. Along with increasing disease severity, the host compensatory capabilities decline, which is manifested by pronounced combined immunodeficiency at the level of local blood flow less evident at peripheral level. These results may contribute to a more accurate assessment of intensity and dynamics of PVV progression to optimize diagnostics and immunological correction.

Key words: *varicose veins of the small pelvis, women, immunity, immunoglobulins, local circulation, systemic circulation, ovarian veins.*

Введение

Проблема варикоза вен малого таза (ВВМТ) у женщин крайне актуальна по причине тесной связи с репродуктивными нарушениями и рецидивом заболевания [17]. Симптоматика ВВМТ отличается характерными признаками: варикозными изменениями вен малого таза, наличием хронических тазовых болей, гемодинамическими нарушениями, кровотечениями [11]. Развитие ВВМТ обусловлено возрастом, наследственностью, малоподвижным образом жизни пациентки, наличием в анамнезе многочисленных беременностей, вредных привычек [14, 17, 19]. Ключевым звеном перестройки венозных стенок является повреждение эндотелия сосудов, обусловленное влиянием атерогенных факторов и хронической эндотоксиновой агрессии вследствие воспалительного процесса [10]. Дисфункция эндотелия, ассоциированная с указанными факторами, характеризуется существенной разницей между синтезом вазодилатирующих, ангиопротективных и вазоконстрикторных, протромбических, пролиферативных компонентов эндотелия [13]. Важным компонентом воспалительных реакций при данной патологии является недостаточность работы системы иммунитета [1, 10, 11]. Дизрегуляция иммунного ответа возможна как на системном, так и на локальном уровнях [8]. Иммунологическая дисфункция и нарушение иммунного надзора за воспалительным процессом имеет место в стенках вен малого таза, что способствует варикозной трансформации сосудов и в конечном итоге обусловливает течение заболевания [1, 18]. Несмотря на проводимые исследования в данной области, результаты анализа иммунных реакций при ВВМТ достаточно противоречивы и в основном касаются общих механизмов [11, 20]. Можно предположить, что изучение клеточно-опосредованных и гуморальных компонентов иммунитета позволит оценить интенсивность и динамику

прогрессирования варикозного изменения вен, а также возможность использования показателей иммунного статуса для оптимизации диагностики и иммунологической коррекции.

На основании вышеизложенного, целью настоящего исследования было изучение особенностей показателей клеточного и гуморального иммунитета в периферическом (локтевая) и локальном (яичниковая) венозных бассейнах у женщин с легкой и среднетяжелой формами ВВМТ.

Материалы и методы

Объектом исследования явились 142 пациентки с ВВМТ, диагноз которого был верифицирован на этапе клинико-инструментального обследования и окончательно подтвержден гистологически. Обследование включало ультразвуковое ангиосканирование тазовых вен и лечебно-диагностическую лапароскопию. Все больные ВВМТ были сопоставимы по возрасту, жалобам, гинекологической и экстрагенитальной патологии. В зависимости от степени тяжести варикозного процесса малого таза, больные были распределены на две группы: I группа включала пациенток с легкой степенью тяжести варикозного процесса (n = 79); II группа — со среднетяжелой степенью (n = 63).

В контрольную группу вошли 30 практически здоровых женщин, которым была выполнена хирургическая стерилизация лапароскопическим доступом на основе добровольного согласия.

Критериями включения в группы пациенток с ВВМТ и контрольную группу явились: женский пол, репродуктивный возраст (20–45 лет), информированное согласие на участие в исследовании.

Критериями включения в группу пациенток с ВВМТ явились: подтвержденный диагноз — первичного ВВМТ по результатам ультразвукового исследования с дуплексным ангиосканированием. Критериями исключения из группы пациенток с ВВМТ явились: наличие сопутствующей соматической патологии, гинекологических заболеваний и органических поражений в малом тазу.

Критериями включения в контрольную группу явились: отсутствие на момент обследования острого заболевания или обострения хронических заболеваний, отсутствие патологии венозной системы.

Критерии исключения для обеих групп: беременность, прием в течение последних 6 месяцев препаратов венотонизирующего, ангиопротективного, антиоксидантного действия или синтетических аналогов женских половых гормонов (гормональные контрацептивы).

Стадийность варикозной трансформации вен при первичном ВВМТ установлена на основании результатов дуплексного ангиосканирования [5, 6]. В качестве критериев степени тяжести ВВМТ были использованы эхографические признаки яичниковых вен, бассейн которых является приоритетным в осуществлении оттока крови из малого таза у женщин. Оценку наличия варикозного расширения вен малого таза проводили на аппарате Voluson GE10 Healthcare (Австрия), с использованием конвексного датчика 4–8 МГц и вагинального датчика 7 МГц. Ультразвуковыми критериями ВВМТ считали эктазию венозных сплетений малого таза более 5 мм в сочетании с ретроградным кровотоком продолжительностью более 0,5 с, регистрируемым при проведении пробы Вальсальвы в режиме цветового допплеровского картирования. Всем пациенткам под 3D-видеоизображением с использованием оборудования фирм «Cooper surgical» (США) и «Laser optic system» (США-Германия) была выполнена лапароскопия, в процессе которой для оценки степени тяжести варикоза малого таза применяли ретроградную гемодинамическую пробу (патент на изобретение) [7], позволяющую регистрировать венэктазии в венозных сплетениях малого таза и выполнить биопсию варикозно-измененных участков вен для гистологической верификации диагноза.

Всем пациенткам проведено комплексное иммунологическое обследование с оценкой иммунного статуса периферической крови (локтевая вена) и локального кровотока малого таза (бассейн яичниковых вен). Кровь забирали натощак с 8:00 до 9:00 часов утра. Определяли количественные и функциональные показатели клеточного звена иммунитета: абсолютное и относительное число лимфоцитов, экспрессию поверхностных лимфоцитарных антигенов $CD3^+$ (Т-лимфоциты), $CD4^+$ (Т-хелперы), $CD8^+$ (Т-супрессоры) и $CD19^+$ (В-лимфоциты). Для идентификации субпопуляций лимфоцитов использовали моноклональные антитела и проточный цитофлюориметр фирмы Becton Dickinson (США). Также рассчитывали иммунореактивный индекс как соотношение процентного содержания Т-хелперов и Т-супрессоров ($CD4^+/CD8^+$). Состояние гуморального звена иммунитета оценивали путем определения концентрации иммуноглобулинов IgA, IgG, IgM методом радиальной иммунодиффузии в геле [15].

Получение информированного согласия на участие в исследовании было обязательной процедурой при включении женщин в одну из групп. Исследование одобрено Комитетом по биомедицинской этике при ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ (Выписка из протокола заседания № 3.1 от 26.10.2012).

Данная работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Центр разработки прогрессивных персонализированных технологий здоровья» ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ, Иркутск.

Статистическая обработка материала проводилась с использованием программы Statistica 10.0 (Statsoft Inc., R США). Описательная статистика полученных данных представлена в виде медиан (Me), первой и третьей квартилей (Q1; Q3) с указанием абсолютных значений и процентов. Сравнение межгрупповых различий выполнено с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. За уровень статистической значимости принимали $p < 0,05$.

Результаты

Анализ показателей клеточного иммунитета у пациенток с ВВМТ обнаружил значимые различия в среднем количестве лимфоцитов в периферической крови в зависимости от степени тяжести заболевания: повышенное их количество во II группе в сравнении с контролем ($p = 0,038$) и I группой ($p = 0,040$) (табл. 1).

У пациенток II группы в периферической крови также отмечались более высокие значения субпопуляций $CD3^+$ ($p = 0,045$) и соотношения $CD4^+/CD8^+$ ($p = 0,047$) относительно контроля (табл. 1). Оценка гуморального звена иммунитета в периферическом кровотоке показала значимое повышение уровня IgM у пациенток II группы в сравнении с контролем ($p = 0,015$) (табл. 1). Концентрация IgM снижалась во II группе в сравнении с контролем ($p = 0,040$) и I группой ($p = 0,030$). Уровень IgG претерпевал сходные изменения во II группе: установлены более низкие значения в сравнении с контролем ($p = 0,019$) и I группой ($p = 0,020$) (табл. 1). В отношении остальных показателей (среднее количество лейкоцитов, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD19^+$) статистически значимых изменений в исследуемых группах выявлено не было ($p > 0,05$) (табл. 1).

Таблица 1. Анализ клеточного и гуморального звеньев иммунитета в периферическом кровотоке у пациенток с ВВМТ (Me [Q_{25}; Q_{75}])

Table 1. Analysis of peripheral blood cellular and humoral immunity in PVI patients (Me [Q_{25}; Q_{75}])

Показатели Parameters	**Контроль** Control n = 30 **(1)**	**Пациентки с ВВМТ (I группа)** PPI patients (group 1) n = 79 **(2)**	**Пациентки с ВВМТ (II группа)** PPI patients (group 2) n = 63 **(3)**	**P, критерий Манна–Уитни** P, Mann–Whitney criterion
Клеточное звено иммунитета Cellular immunity				
Лейкоциты, × 10^9 Leukocytes, × 10^9	5592 (4790; 5831)	6179 (5868; 6593)	6731 (6326; 7155)	
Лимфоциты, × 10^9 Lymphocytes, × 10^9	1659 (1430; 1860)	1768 (1672; 1812)	2050 (1895; 2110)	p_{1-3} p_{2-3}
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	28% (24; 31)	31,5% (27; 35)	33% (28; 37)	
$CD3^+$, %	53,42 (51,6; 56,3)	54,36 (51,7; 57,2)	56,83 (52,9; 58,5)	p_{1-3}
$CD4^+$, %	36,5 (35,7; 37,6)	36,9 (36,1; 37,4)	37,5 (36,8; 38,1)	
$CD8^+$, %	27,3 (24,5; 30,7)	26,8 (22,8; 32,3)	25,8 (20,6; 31,5)	
$CD4^+/CD8^+$	1,19 (1,08; 1,3)	1,22 (1,1; 1,32)	1,29 (1,15; 1,47)	p_{1-3}
$CD19^+$, %	11,4 (10,7; 11,8)	11,2 (10,5; 11,6)	11 (10,3; 11,2)	
Гуморальное звено иммунитета Humoral immunity				
IgA, г/л IgA, g/L	3,14 (2,9; 3,3)	3,32 (3,1; 3,5)	3,39 (3,2; 3,5)	p_{1-3}
IgM, г/л IgM, g/L	1,05 (0,9; 1,3)	1,03 (0,8; 1,4)	0,85 (0,7; 1,0)	p_{1-3} p_{2-3}
IgG, г/л IgG, g/L	14,58 (13,92; 15,36)	14,25 (13,06; 15,07)	10,21 (9,52; 10,93)	p_{1-3} p_{2-3}

Примечание. p — статистически значимые различия между группами.

Note. p — significant inter-group differences.

Результаты исследования содержания показателей иммунитета в локальном кровотоке малого таза представлены в табл. 2.

Оценка параметров клеточного иммунитета в локальном кровотоке у пациенток с ВВМТ показала значимость различий в среднем количестве лейкоцитов во II группе относительно первой (p = 0,04) (табл. 2). Процентное соотношение лимфоцитов также возрастало во II группе относительно контроля (p = 0,010). Уровень субпопуляций $CD3^+$ снижался у пациенток 1 (p = 0,045) и 2 (p = 0,030) групп относительно контроля (табл. 2). При этом значения $CD4^+$ также снижались в 1 (p = 0,045) и 2 (p = 0,030) группах относительно контрольных значений (табл. 2). Соотношение $CD4^+/CD8^+$ снижалось только во II группе относительно контроля (p = 0,040) (табл. 2). Оценка гуморального звена иммунитета в локальном кровотоке показала значимое повышение уровня IgA у пациенток II группы в сравнении с контролем (p = 0,046). Отмечены более низкие значения концентраций IgM и IgG во II группе в сравнении с контролем (p = 0,010 и p = 0,026) и I группой (p = 0,028 и p = 0,014).

Обсуждение

Согласно нашим данным, начало формирования ВВМТ (легкая степень тяжести ВВМТ) характеризовалось умеренными изменениями показателей системы иммунитета, что проявлялось лимфоцитопенией (снижением уровня $CD3^+$ и $CD4^+$ лимфоцитов) в локальном кровотоке. Показатель $CD3^+$ отражает абсолютное количество Т-лимфоцитов, отвечающих за иммунный надзор за антигенным гомеостазом в организме [4]. $CD4^+$-клетки являются неотъемлемой частью иммунной системы [4, 8]. Так, являясь корецептором рецептора Т-клеток (TCR), помогает последнему взаимодействовать с антигенпрезен-

Таблица 2. Анализ клеточного и гуморального звеньев иммунитета в бассейне вен малого таза у пациенток с ВВМТ (Me [Q_{25}; Q_{75}])

Table 2. Analysis of small pelvis veins basin cellular and humoral immunity in PVI patients (Me [Q_{25}; Q_{75}])

Показатели Parameters	**Контроль** Control n = 30 **(1)**	**Пациентки с ВВМТ (I группа)** PPI patients (group 1) n = 79 **(2)**	**Пациентки с ВВМТ (II группа)** PPI patients (group 2) n = 63 **(3)**	**P, критерий Манна–Уитни** P, Mann–Whitney criterion
Клеточное звено иммунитета Cellular immunity				
Лейкоциты, × 10^9 Leukocytes, × 10^9	7253 (7160; 7538)	8022 (7849; 8193)	8327 (8150; 8683)	p_{1-3}
Лимфоциты, × 10^9 Lymphocytes, × 10^9	1842 (1768; 2051)	1933 (1844; 2069)	2053 (1920; 2142)	
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	30,8 (25,7; 36,1)	33,5 (25,7; 36,1)	35,7 (30,2; 39,4)	p_{1-3}
$CD3^+$, %	58,1 (55,8; 63,1)	46,5 (41,9; 50,2)	42,7 (38,5; 46,3)	p_{1-2} p_{1-3}
$CD4^+$, %	37,9 (36,5; 38,6)	33,1 (31,4; 35,3)	32,5 (29,4; 36,2)	p_{1-2} p_{1-3}
$CD8^+$, %	26,8 (25,3; 27,7)	25,5 (24,8; 36,5)	24,7 (23,9; 25,4)	
$CD4^+/CD8^+$	1,31 (1,10; 1,26)	1,29 (1,3; 1,7)	1,21 (1,25; 1,34)	p_{1-3}
$CD19^+$, %	11,6 (11,0; 12,2)	10,9 (10,2; 10,26)	10,8 (10,1; 11,2)	
Гуморальное звено иммунитета Humoral immunity				
IgA, г/л IgA, g/L	3,20 (3,16; 3,24)	3,41 (3,34; 3,46)	3,52 (3,48; 3,57)	p_{1-3}
IgM, г/л IgM, g/L	1,09 (1,02; 1,16)	0,98 (0,95; 1,07)	0,72 (0,66; 0,79)	p_{1-3} p_{2-3}
IgG, г/л IgG, g/L	15,75 (15,69; 15,80)	15,10 (15,02; 15,18)	9,53 (9,45; 10,10)	p_{1-3} p_{2-3}

Примечание. p — статистически значимые различия между группами.

Note. p — significant inter-group differences.

тирующими клетками, запуская, таким образом, ряд механизмов, способствующих реализации основной защитной функции [4]. Снижение данных параметров в локальном кровотоке женщин с ВВМТ, может указывать на первичную недостаточность системы клеточного иммунитета при легком течении заболевания. В периферическом кровотоке данной когорты женщин изменений выявлено не было.

При среднетяжелой степени ВВМТ имели место более выраженные изменения показателей системы иммунитета, как на локальном, так и на системном уровнях. Причем, если в периферическом кровотоке в клеточном звене отмечались повышенные уровни общего количества лимфоцитов, Т-лимфоцитов и иммунореактивного индекса, то в локальном кровотоке изменения носили уже более депрессивный характер в виде падения концентраций данных параметров и соотношения $CD4^+/CD8^+$.

Выяснение патогенетических механизмов нарушений венозной гемодинамики области таза у женщин до сих пор изучено недостаточно. Большинство исследований свидетельствует о мультифокальном происхождении изменений в стенке вены [1, 18]. Данное явление заключается в том, что заболевание может стартовать в любом отделе поверхностной венозной системы и начало патологического процесса возможно в нескольких участках одновременно [1, 16]. Это связывают с нарушениями регуляции деградации внеклеточного матрикса, видоизменениями его составляющих — эластина и коллагена, снижением объема гладкомышечных клеток [9]. Особая роль отводится иммунной дизрегуляции в развитии данного процесса. Так, отмечено, что помимо вышеперечисленных нарушений, в варикозно-расширенных венах имеет место выраженная активация лейкоцитов, которая сопровождается избыточным выделением активных форм кислорода, активацией протеазы и деградацией гладкомышечных клеток [1, 2, 6, 12].

Таким образом, повышение общего количества лейкоцитов и лимфоцитов в локальном кровотоке у пациенток с ВВМТ выглядит вполне закономерным явлением. Кроме того, локальный кровоток у пациенток со среднетяжелым течением характеризовался дальнейшим снижением уровня $CD3^+$ лимфоцитов в сравнении с легким течением ВВРТ, а также аналогичными низкими значениями Т-хелперов, как и в при предыдущей стадии.

При среднетяжелом течении у пациенток также наблюдалось снижение иммунореактивного индекса ($CD4^+/CD8^+$). Поскольку соотношение $CD4^+/CD8^+$ является одним из важнейших показателей функции адаптивного иммунитета, то снижение этого индекса у больных с ВВМТ может свидетельствовать о дисбалансе двух важных субпопуляций Т-лимфоцитов — Т-хелперов и Т-супрессоров. Венозная недостаточность сопровождается развитием активного воспалительного процесса, с превалированием провоспалительных цитокинов и молекул адгезии, что провоцирует развитие явлений гипертрофии в стенке вен [20]. Нарушение целостности эндотелия, регистрируемое при варикозе, также вызывает инфильтрацию лейкоцитами, их активацию и воспаление, что приводит к дальнейшему повреждению венозной стенки, фиброзу и, как следствие, прогрессированию варикозного расширения [1, 20]. Одновременно, моноциты и макрофаги мигрируют в стенку вены и клапанов, а венозный застой вызывает высвобождение провоспалительных интерлейкинов этими клетками. При этом значительные нарушения в клеточном звене системы иммунитета в локальном кровотоке сопровождались компенсаторными системными реакциями (повышенные показатели $CD3^+$ и $CD4^+/CD8^+$).

Резюмируя изложенное выше, можно говорить о более выраженной дизрегуляции иммунитета в локальном кровотоке, чем в периферическом, у пациенток со среднетяжелым течением ВВРТ.

Гуморальное звено иммунитета в данном случае отличалось более схожими изменениями в обеих видах кровотока. Так, определение концентрации основных сывороточных иммуноглобулинов (IgA, M, G) показало развитие дисгаммаглобулинемии в виде однонаправленного роста IgA с противоположной динамикой продукции IgM и IgG — снижением от I к II степени тяжести патологического процесса. Указанные изменения могут подтверждать наличие дизрегуляторных процессов в гуморальном звене иммунитета у пациенток. Характерной особенностью иммунного ответа гуморального типа является выработка антител, которые одновременно являются эффекторами В-звена иммунной системы [8]. Подавление иммунных резервов на локальном и системном уровнях при наличии различного рода антигенных раздражителей может проявляться персистенцией микробных и бактериальных антигенов с формированием хронического рецидивирующего воспаления в бассейне яичниковых вен малого таза. При этом снижение количества иммуноглобулинов может свидетельствовать о повышенном образовании патологических циркулирующих комплексов, повреждающих собственные микроструктуры с образованием серии аутоантигенов, инициирующих формирование аутоагрессивных антител [3].

Заключение

Можно заключить, что развитие ВВМТ у женщин связано с комплексом патологических изменений, ассоциирующихся с иммуно-

логическими факторами. При легкой степени тяжести ВВМТ, изменения в локальном кровотоке являются первичными и характеризуются нарушениями в клеточном звене иммунитета. С увеличением степени тяжести заболевания компенсаторные возможности организма снижаются, что проявляется выраженным комбинированным изменением показателей иммунитета на уровне локального кровотока (локальным «иммунодефицитом») и менее выраженными проявлениями на уровне периферии. Данные результаты могут способствовать более точной оценке интенсивности и динамики прогрессирования варикозного изменения вен малого таза с целью оптимизации диагностики и иммунологической коррекции.

Список литературы/References

1. Головина В.И., Селиверстов Е.И., Ефремова О.И., Золотухин И.А. Роль цитокинов в патогенезе варикозной болезни // Флебология. 2021. Т. 15, № 2. С. 117–126. [Golovina V.I., Seliverstov E.I., Efremova O.I., Zolotukhin I.A. Cytokines in pathogenesis of varicose veins. *Flebologiya = Flebologiya, 2021,vol. 15, no. 2, pp. 117–126. (In Russ.)*] *doi: 10.17116/flebo202115021117*
2. Даренская М.А., Ступин Д.А., Семендяев А.А., Колесников С.И., Гребенкина Л.А., Щербатых А.В., Толкачев К.С., Колесникова Л.И. Сравнительный анализ липопероксидации в периферическом и регионарном кровотоках у женщин с первичным варикозным расширением вен малого таза // Клиническая лабораторная диагностика. 2022. Т. 67, № 7. С. 374–380. [Darenskaya M.A., Stupin D.A., Semendyaev A.A., Kolesnikov S.I., Grebenkina L.A., Shcherbatykh A.V., Tolkachev K.S., Kolesnikova L.I. Peripheral and regional blood bloodstreams lipid peroxidation comparative analysis in women with pelvic venous disorder. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics, 2022, vol. 67, no. 7, pp. 374–380. (In Russ.)*] *doi: 10.51620/0869-2084-2022-67-7-374-380*
3. Зинатулина Г.М., Фазылов В.Х., Василькин Д.А. Особенности иммунного статуса у больных микробной экземой и рожей: метод терапевтической коррекции // Вестник дерматологии и венерологии. 2016. № 2. С. 87–94. [Zinatulina G.M., Fayzullina E.V., Fazyilov V.H., Vasilkin D.A. Particular features of the immune status in microbial eczema and erysipelas patients: a therapeutic method. *Vestnik dermatologii i venerologii = Vestnik Dermatologii i Venerologii, 2016, no. 2, pp. 87–95. (In Russ.)*]
4. Карзакова Л.М., Кудряшов С.И., Луткова Т.С., Соколова Е.В., Сидоров И.А. Основы общей иммунологии: учеб. пособие. Чебоксары: Издательство Чувашского университета, 2020. 200 с. [Karzakova L.M., Kudryashov S.I., Lutkova T.S., Sokolova E.V., Sidorov I.A. Fundamentals of general immunology: tutorial. *Cheboksary: Chuvash University Publishing, 2020. 200 p. (In Russ.)*]
5. Колесникова Л.И., Семендяев А.А., Ступин Д.А., Даренская М.А., Гребёнкина Л.А., Натяганова Л.В., Данусевич И.Н., Черепанова М.А., Колесников С.И. Интенсивность процессов липопероксидации у женщин с первичным варикозным расширением вен малого таза в зависимости от стадии заболевания // Вестник Российской академии медицинских наук. 2018. Т. 73, № 4. С. 229–235. [Kolesnikova L.I., Semendyaev A.A., Stupin D.A., Darenskaya M.A., Grebenkina L.A., Natyaganova L.V., Danusevich I.N., Cherepanova M.A., Kolesnikov S.I. The intensity of lipid peroxidation processes in women with primary varicose veins of the pelvic depending on the stage of the disease. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences, 2018, vol. 73, no. 4, pp. 229–235. (In Russ.)*] *doi: 10.15690/vramn1005*
6. Колесникова Л.И., Гус А.И., Семендяев А.А., Ступин Д.А., Даренская М.А., Колесников С.И., Гребенкина Л.А., Щербатых А.В., Калягин А.Н., Пурбуева В.Н. Варикозная болезнь вен малого таза у женщин. Новосибирск: Наука, 2020. 156 с. [Kolesnikova L.I., Gus A.I., Semendyaev A.A., Stupin D.A., Darenskaya M.A., Kolesnikov S.I., Grebenkina L.A., Shcherbatykh A.V., Kalyagin A.N., Purbueva V.N. Pelvic varicosis in women. *Novosibirsk: Nauka, 2020. 156 p. (In Russ.)*]
7. Патент № 2646563 Российская Федерация, МПК A61B 10/00 (2006.01). Способ определения функционального состояния венозной системы малого таза у женщин: № 2016124576; заявлено 2016.06.20: опубликовано 2018.05.03 / Семендяев А.А., Ступин Д.А., Черепанова М.А., Бачурина В.М., Селецкий А.Н., Колесникова Л.И. Патентообладатель: Семендяев Андрей Александрович. 5 с. [Patent No. 2646563 Russian Federation, Int. Cl. A61B 10/00 (2006.01). Method for determining the functional state of the venous system of the small pelvis in women. No. 2016124576; application: 2016.06.20: date of publication 2018.05.03 / Semendyaev A.A., Stupin D.A., Cherepanova M.A., Bachurina V.M., Seletsky A.N., Kolesnikova L.I. Proprietors: Semendyaev Andrei Aleksandrovich. 5 p.]
8. Тотолян А.А. Современные подходы к диагностике иммунопатологических состояний // Медицинская иммунология. 1999. Т. 1, № 1–2. С. 75–108. [Totolian A.A. Modern approaches to the diagnosis of immunopathological conditions. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 1999, vol. 1, no. 1–2, pp. 75–108. (In Russ.)*]
9. Фомин В.С., Фомина М.Н. Варикозное расширение вен малого таза как причина синдрома хронических тазовых болей: взгляд на проблему // Фарматека. 2017. Т. 18, № 351. С. 14–19. [Fomin V.S., Fomina M.N. Varicose veins of the small pelvis as a cause of chronic pelvic pain syndrome: a look at the problem. *Farmateka = Farmateka, 2017, vol. 18, no. 351, pp. 14–19. (In Russ.)*]
10. Bałabuszek K., Toborek M., Pietura R. Comprehensive overview of the venous disorder known as pelvic congestion syndrome. *Ann. Med., 2022, vol. 54, no. 1, pp. 22–36. doi: 10.1080/07853890.2021.2014556*
11. Barge T.F., Uberoi R. Symptomatic pelvic venous insufficiency: a review of the current controversies in pathophysiology, diagnosis, and management. *Clin. Radiol., 2022, vol. 77, no. 6, pp. 409–417. doi: 10.1016/j.crad.2022.01.053*
12. Darenskaya M.A., Stupin D.A., Semendyaev A.A., Kolesnikov S.I., Shcherbatykh A.V., Tolkachev K.S., Kolesnikova L.I. Pelvic venous insufficiency: lipid peroxidation levels in ovarian venous blood. *Biomed. Res. Ther., 2022, vol. 9, no. 2, pp. 4884–4891. doi: 10.15419/bmrat.v9i2.730*
13. Gavrilov S.G., Vassilieva G.Y., Vasilev I.M., Grishenkova A.S. The role of vasoactive neuropeptides in the genesis of venous pelvic pain: a review. *Phlebology, 2020, vol. 35, no. 1, pp. 4–9. doi: 10.1177/0268355519855598*
14. Khilnani N.M., Winokur R.S., Scherer K.L., Meissner M.H. Clinical presentation and evaluation of pelvic venous disorders in women. *Tech. Vasc. Interv. Radiol., 2021, vol. 24, no. 1: 100730. doi: 10.1016/j.tvir.2021.100730*

15. Mancini G., Carbonara A.O., Heremans J.F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry, 1965, no. 2, pp. 235–254. doi: 10.1016/0019-2791(65)90004-2*
16. Meissner M.H., Gloviczki P., Bergan J., Kistner R.L., Morrison N., Pannier F., Pappas P.J., Rabe E., Raju S., Villavicencio J.L. Primary chronic venous disorders. *J. Vasc. Surg., 2007, vol. 46, suppl. S, pp. 54S–67S. doi: 10.1016/j.jvs.2007.08.038*
17. Riding D.M., Hansrani V., McCollum C. Pelvic vein insufficiency: clinical perspectives. *Vasc. Health Risk Manag., 2017, vol. 13: 439. doi: 10.2147/VHRM.S132827*
18. Sayer G.L., Smith P.D.C. Immunocytochemical characterisation of the inflammatory cell infiltrate of varicose veins. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg., 2004, vol. 5, no. 28, pp. 479–483. doi: 10.1016/j.ejvs.2004.07.023*
19. Seryapina Yu.V., Sevost'yanova K.S., Tulupov A.A., Morozov V.V., Shevela A.I. The genetic predictors of varicose veins of small pelvis: a pilot study. *Flebologiya, 2018, vol. 12, no. 1, pp. 25–29. doi: 10.17116/flebo201812125-29*
20. Spath P., Tisato V., Gianesini S., Tessari M., Menegatti E., Manfredini R., Occhionorelli S., Secchiero P., Zamboni P. The calendar of cytokines: seasonal variation of circulating cytokines in chronic venous insufficiency. *JRSM Cardiovasc. Dis., 2017, no. 6: 2048004017729279. doi: 10.1177/2048004017729*

Авторы:
Даренская М.А., д.б.н., профессор РАН, главный научный сотрудник лаборатории патофизиологии ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;
Семендяев А.А., д.м.н., профессор кафедры акушерства и гинекологии с курсом гинекологии детей и подростков ФГБОУ ВО Иркутский государственный медицинский университет, г. Иркутск, Россия;
Ступин Д.А., к.м.н., докторант ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия; ассистент кафедры акушерства и гинекологии с курсом гинекологии детей и подростков ФГБОУ ВО Иркутский государственный медицинский университет, г. Иркутск, Россия;
Колесников С.И., академик РАН, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;
Семенова Н.В., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории патофизиологии ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;
Пестерев К.В., аспирант кафедры акушерства и гинекологии с курсом гинекологии детей и подростков ФГБОУ ВО Иркутский государственный медицинский университет, г. Иркутск, Россия;
Колесникова Л.И., академик РАН, д.м.н., профессор, научный руководитель ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия.

Authors:
Darenskaya M.A., DSc (Biology), Professor of the RAS, Leading Researcher, Laboratory of Pathophysiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;
Semendyaev A.A., DSc (Medicine), Professor of the Department of Obstetrics and Gynecology with a Course of Gynecology for Children and Adolescents, Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russian Federation;
Stupin D.A., PhD (Medicine), Doctoral Candidate, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation; Assistant Professor, Department of Obstetrics and Gynecology with a Course of Gynecology for Children and Adolescents, Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russian Federation;
Kolesnikov S.I., RAS Full Member, DSc (Medicine), Professor, Head Researcher, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;
Semenova N.V., DSc (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Pathophysiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;
Pesterev K.V., Postgraduate Student, Department of Obstetrics and Gynecology with a course of Gynecology for Children and Adolescents, Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russian Federation;
Kolesnikova L.I., RAS Full Member, DSc (Medicine), Professor, Scientific Director, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 30.12.2022
Принята к печати 18.02.2023

Received 30.12.2022
Accepted 18.02.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 2, pp. 363–368

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 2, с. 363–368

РАЗЛИЧИЯ ИММУННОГО РЕАГИРОВАНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОПИСТОРХОЗНОЙ ИНВАЗИЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЛИЧИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ ЗАБОЛЕВАНИЙ ОРГАНОВ ГЕПАТОБИЛИАРНОЙ СИСТЕМЫ

С.А. Григорьева, К.Б. Степанова, Т.Ф. Степанова, Г.А. Кальгина, Л.В. Курлаева

ФБУН Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Тюмень, Россия

Резюме. Целью исследования было выявление различий в иммунном реагировании при хроническом описторхозе в зависимости от наличия или отсутствия клинических проявлений заболеваний гепатобилиарной системы. Проведено сопоставление лабораторных показателей функционирования иммунной системы организма (выявленные методом проточной цитометрии фенотипы лимфоцитов, концентрации иммуноглобулинов и цитокинов, показатели неспецифической резистентности) у больных хроническим описторхозом (вызванным *Opisthorchis felineus*) без клинических проявлений и с проявлениями холецистита, холангита, панкреатита, гастрита, гастродуоденита, подтвержденных по результатам УЗИ и ФГДС. Обнаружено, что иммунологические показатели врожденного иммунного ответа повышены у всех пациентов с хроническим описторхозом по сравнению с контрольной группой условно здоровых людей, что свидетельствует об активации макрофагально-фагоцитарного звена у пациентов с описторхозной инвазией. Показатель стимулированного варианта НСТ-теста максимален при хроническом описторхозе без заболеваний гепатобилиарной системы; при наличии таких заболеваний он снижается, но остается достоверно выше значений контрольной группы. Это может быть связано с истощением резервных возможностей бактерицидных систем нейтрофилов у пациентов с симптомами поражения гепатобилиарной системы из-за длительно протекающего воспаления. Показатели клеточного звена у пациентов с хронической описторхозной инвазией без клинических проявлений заболеваний гепатобилиарной системы демонстрируют снижение абсолютного и относительного количества цитотоксических Т-лимфоцитов. В группе с клиникой поражения гепатобилиарной системы выявляется еще более глубокий дисбаланс показателей: снижено относительное и абсолютное количество лимфоцитов, абсолютное количество Т-лимфоцитов, что может указывать на вовлечение клеточного иммунитета в патогенез осложнений хронического описторхоза. У всех обследованных пациентов с хроническим описторхозом также активирован гуморальный иммунный ответ — значительно повышено содержание общего IgE; при этом у пациентов с клиникой поражения гепатобилиарной системы этот показатель еще более возрастает, и выявляется снижение В-лимфоцитов. У всех пациентов с хронической описторхозной ин-

Адрес для переписки:
Григорьева Светлана Андреевна
625026, Россия, г. Тюмень, ул. Республики, 147,
ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (3452) 28-99-93.
E-mail: info@Tniikip.rospotrebnadzor.ru

Contacts:
Svetlana A. Grigorieva
625026, Russian Federation, Tyumen, Respubliki str., 147,
Tyumen Region Infection Pathology Research Institute.
Phone: +7 (3452) 28-99-93.
E-mail: info@Tniikip.rospotrebnadzor.ru

Для цитирования:
Григорьева С.А., Степанова К.Б., Степанова Т.Ф., Кальгина Г.А., Курлаева Л.В. Различия иммунного реагирования у пациентов с хронической описторхозной инвазией в зависимости от наличия клинических проявлений заболеваний органов гепатобилиарной системы // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 2. С. 363–368. doi: 10.15789/2220-7619-DII-2099

Citation:
Grigorieva S.A., Stepanova K.B., Stepanova T.F, Kalgina G.A., Kurlaeva L.V. Differences in immune response in patients with chronic opisthorchiasis invasion related to clinical manifestations of hepatobiliary system diseases // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 2, pp. 363–368. doi: 10.15789/2220-7619-DII-2099

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-DII-2099

вазией отмечается также повышенный уровень провоспалительного цитокина IL-8, который еще более возрастает в группе с заболеваниями гепатобилиарной системы. Полученные данные свидетельствуют о вовлечении всех звеньев иммунного ответа в выраженный воспалительный процесс при осложнении хронического описторхоза клинически выраженными заболеваниями гепатобилиарной системы: степень отклонения показателей врожденного и адаптивного иммунного ответа от нормы и от показателей неосложненного описторхоза увеличивается.

Ключевые слова: *хроническая описторхозная инвазия, популяции лимфоцитов, врожденный иммунный ответ, адаптивный иммунный ответ, заболевания гепатобилиарной системы, DNT-лимфоциты, цитокины.*

DIFFERENCES IN IMMUNE RESPONSE IN PATIENTS WITH CHRONIC OPISTHORCHIASIS INVASION RELATED TO CLINICAL MANIFESTATIONS OF HEPATOBILIARY SYSTEM DISEASES

Grigorieva S.A., Stepanova K.B., Stepanova T.F, Kalgina G.A., Kurlaeva L.V.

Tyumen Research Institute of Regional Infectious Pathology, Tyumen, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to identify differences in the immune response in chronic opisthorchiasis with or without clinical manifestations of hepatobiliary system diseases. A comparison of laboratory parameters of immune system functioning (lymphocyte phenotypes detected by flow cytometry, concentrations of immunoglobulins and cytokines, indicators of nonspecific resistance) in patients with chronic opisthorchiasis (caused by *Opisthorchis felineus*) lacking clinical manifestations and with manifestations of cholecystitis, cholangitis, pancreatitis, gastritis, gastroduodenitis, confirmed by ultrasound and FGDS. It was found that the immunological parameters of the innate immune response were increased in all patients with chronic opisthorchiasis compared with the control group of apparently healthy subjects, which indicates activated macrophage-phagocytic arm in patients with opisthorchiasis invasion. The indicator of the stimulated NBT test is maximal in chronic opisthorchiasis without hepatobiliary system diseases, in case of comorbidity with such diseases it declines, but remains significantly higher than the values of the control group. This may be due to the exhaustion in the reserve capabilities of bactericidal neutrophil systems in patients with symptoms of damage to the hepatobiliary system due to prolonged inflammation. Indicators of the cellular arm in patients with chronic opisthorchiasis without clinical manifestations of hepatobiliary system diseases demonstrate a decrease in the absolute and relative level of cytotoxic T-lymphocytes. In the group with picture of hepatobiliary system disorders, an even deeper imbalance of indicators is revealed: the relative and absolute level of lymphocytes, the absolute count of T-lymphocytes are reduced, which may indicate about involvement of cellular immunity in the pathogenesis of complications of chronic opisthorchiasis. In all examined patients with chronic opisthorchiasis, the humoral immune response was also activated — the total immunoglobulin E was significantly increased; at the same time, in patients with hepatobiliary system lesions, this parameter increases even more and a decrease in B-lymphocytes is detected. In all patients with chronic opisthorchiasis, there is also an increased level of proinflammatory cytokine IL-8, which rises even more in the group with hepatobiliary system diseases. The data obtained indicate the involvement of all arms of the immune response in a prominent inflammatory process when chronic opisthorchiasis is complicated by clinically overt hepatobiliary system diseases: the degree of deviation in the indicators of the innate and adaptive immune response from the norm and from those in uncomplicated opisthorchiasis increases.

Key words: *chronic opisthorchiasis, lymphocyte populations, innate immune response, adaptive immune response, diseases of the hepatobiliary system, DNT-lymphocytes, cytokines*

Введение

Описторхоз — широко распространенная гельминтозная инвазия в России. Крупнейшим эндемическим очагом описторхоза в мире является бассейн реки Обь в Западной Сибири. Пищевые трематоды *Opisthorchis felineus* колонизируют желчные протоки печени рыбоядных млекопитающих, включая человека. У хронически инвазированных людей это повреждает гепатобилиарную систему (ГБС), вызывая хроническое воспаление, перидуктальный фиброз, билиарную интраэпителиальную неоплазию и даже холангиокарциному [13, 14]. Несмотря на многочисленные патоморфологические исследования, системный иммунный ответ и клеточный патогенез этих нарушений изучены недостаточно. При гельминтозах реакция иммунной системы, направленная на защиту от инвазии, является одновременно одним из главных механизмов патогенеза: иммунологические реакции, переходя границы адекватного физиологического ответа, становятся иммунопатологическими, являясь причиной тяжелых органных поражений [10]. Выраженность иммунологического ответа обычно соответствует интенсивности инвазии и иммуногенности паразита. Степень изменений показателей иммунного ответа при описторхозе, как правило, коррелирует с тяжестью течения заболевания [9]. При переходе заболевания в хроническую стадию аллергическое влияние паразитов уменьшается и в клинике преобладают симптомы поражения внутренних органов [10].

Клиническая картина заболеваний развивается в результате воспалительного процесса в желчных протоках и желчном пузыре. Хроническое воспаление слизистой оболочки желчевыводящих путей, способствует застою желчи, повышению давления в желчных протоках с развитием внутрипеченочного холестаза, о чем свидетельствуют нарушения в биохимических показателях крови [1]. Наряду с дистрофическими изменениями поверхностного эпителия слизистой желудка наблюдается отек, массивная инфильтрация лимфогистиоцитарными элементами, плазматическими клетками, большим количеством эозинофилов, что свидетельствует об иммунологической природе воспаления и важной роли иммунологических реакций в организме при хроническом описторхозе [2].

В настоящей работе исследовали показатели иммунного реагирования при хроническом описторхозе в зависимости от наличия или отсутствия клинических проявлений заболеваний ГБС (холецистит, холангит, панкреатит, гастрит, гастродуоденит).

Материалы и методы

Обследовано 78 человек с диагнозом «Хронический описторхоз» (ХО) и 50 условно здоровых лиц. Обследуемые были разделены на три группы (в каждой примерно равное соотношение мужчин и женщин). Первая группа — контрольная (50 условно здоровых лиц, КГ), медиана возраста 40 (33–50) лет. Вторая группа — 21 пациент с хроническим описторхозом (ХО) без клинических проявлений заболеваний ГБС, медиана возраста 44 (35–59) года. Третья группа — 57 пациентов с хроническим описторхозом и клиническими проявлениями заболеваний ГБС (холецистит, холангит, панкреатит, гастрит, гастродуоденит), медиана возраста 56 (37–61) лет. Для подтверждения диагноза описторхоза использовались копроовоскопия и дуоденальное зондирование. Для подтверждения диагнозов заболеваний ГБС пациентам проводили ультразвуковую диагностику органов брюшной полости и фиброгастродуоденоскопию.

У всех трех групп пациентов определяли следующий спектр иммунологических показателей.

Исследование фенотипа лимфоцитов проводили методом проточной цитометрии цельной периферической крови с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, США), меченных FITC (fluorescein isothiocyanate), PE (phyco-erythrin), ECD (phycoerythrin-TexasRed-X) и PC5 (phycoerythrin-cyanin 5). Лизис эритроцитов проводили по безотмывочной технологии с использованием лизирующего раствора OptiLys C Lysis Solution. Окраску антителами и лизирование проводили в соответствии с рекомендациями производителя. Анализировали окрашенные клетки на проточном цитофлуориметре Cytomics FC-500 (Beckman Coulter, США). Использовалось трехцветное иммунофенотипирование по панелям: CD3/CD4/CD45, CD3/CD8/CD45, CD3/CD16$^+$56/CD45 и CD3/CD19/CD45. Основные фенотипы лимфоцитов: Т-лимфоциты (CD3$^+$CD19$^-$CD16/56$^-$CD45$^+$), Т-хелперы (CD3$^+$CD4$^+$CD45$^+$), Т-цитотоксические (CD3$^+$CD8$^+$CD45$^+$), NK-клетки (CD3$^-$CD16/56$^+$CD45$^+$), В-лимфоциты (CD3$^-$CD19$^+$CD45$^+$). Абсолютные значения были получены по двухплатформенной технологии с использованием результатов гематологического анализа. Концентрацию иммуноглобулинов A, M, G и E в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом (Multiskan FC, Thermo Scientific) с помощью коммерческих наборов «Иммуноскрин-G, M, A-ИФА-БЕСТ» и «IgE-общий-ИФА-БЕСТ» (Вектор-Бест, Россия). Концентрацию цитокинов (IFNγ, IL-4, IL-8, IL-10) определяли иммуноферментным методом (Multiskan FC, Thermo Scientific) с помощью коммерческих наборов «Гамма-интерферон-ИФА-БЕСТ», «Интерлейкин-4-ИФА-БЕСТ», «Интерлейкин-8-ИФА-БЕСТ», «Интерлейкин-10-ИФА-БЕСТ» (Вектор-Бест, Россия). Неспецифическая резистентность определялась по поглотительной способности нейтрофилов в тесте с частицами латекса (d 1 мкм) (ООО «ДИАЭМ», Москва). Анализу подвергались 200 нейтрофилов, после чего вычисляли процент нейтрофилов, имеющих поглощенные частицы [7]. Метаболическую активность нейтрофилов определяли цитохимическим методом восстановления нитросинего тетразолия (ООО «ДИАЭМ», Москва) до диформазана. О степени активности нейтрофилов судили по количеству захваченного формазана. Спонтанный НСТ-тест отражал степень функционального раздражения нейтрофилов *in vitro*, стимулированный вариант (10% раствор пирогенала) характеризовал функциональный резерв [7]. Определение активности фермента миелопероксидазы нейтрофилов проводили спектрофотометрическим методом [11].

Статистическая обработка результатов исследования выполнена с использованием пакета программ Statistics Kingdom (https://www.statskingdom.com). Оценка значимости различий между группами проводилась с помощью теста Краскела–Уоллиса, при выявлении значимых различий проводили попарные сравнения с помощью непараметрического критерия U Манна–Уитни с поправкой Бонферрони. Количественные показатели представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q_{25}–Q_{75}). Критический уровень значимости принимался равным 5%.

Результаты

Исследование иммунного реагирования пациентов с хронической описторхозной инвазией в сравнении с группой здоровых лиц выявило различия в показателях макрофагально-фагоцитарного звена. У пациентов с ХО (2 и 3 групп) обнаружено повышение активности фермента нейтрофилов миелопероксидазы, повышение поглотительной активности нейтрофилов и показателей спонтанного и стимулированного вариантов НСТ-теста (табл.).

В обеих группах пациентов с хронической описторхозной инвазией по сравнению с контрольной группой снижается относительное и абсолютное количество CD8-лимфоцитов, повышается концентрация общего IgE.

При осложнении течения хронического описторхоза заболеваниями ГБС степень отклонения показателей адаптивного иммунного ответа от нормы увеличивается, только в этой группе выявляются достоверные отличия от контрольной: снижение относительного и абсолютного количества лимфоцитов, абсолютного количества CD3, абсолютного количества В-лимфоцитов (CD19).

Выявлены различия иммунологических показателей между группами пациентов с хронической описторхозной инвазией:

– показатели фагоцитарного звена иммунитета: у пациентов с клиникой поражения ГБС ниже показатель стимулированного варианта НСТ-теста чем в группе без клиники поражения ГБС;

– показатели гуморального звена: в группе с клиникой поражения ГБС выше концентрация общего IgE;

– показатели цитокинового звена: у пациентов с клиникой поражения ГБС концентрация провоспалительного цитокина IL-8 значительно выше (рис.).

Достоверных различий в показателях клеточного звена иммунного ответа между группами не обнаружено.

Обсуждение

Показатели врожденного иммунного ответа у инвазированных *Opisthorchis felineus* в исследованиях Кальгиной Г.А. демонстрировали активацию фагоцитарного звена иммунитета [5]. Исследование влияния антигенов *O. viverrini* на фенотип нейтрофилов у инвазированных пациентов [12] также выявило активацию нейтрофилов, усиливающуюся у лиц с заболеваниями печени. Активация проявляется в способности вызывать повреждение тканей и генерировать провоспалительные молекулы. В нашем исследовании иммунологические показатели врожденного иммунного ответа у пациентов с хроническим описторхозом повышены в группах и с клиникой заболеваний ГБС, и без проявлений нарушения функционирования органов ГБС, что подтверждает активацию макрофагально-фагоцитарного звена у пациентов с описторхозной инвазией. При этом между группами с ХО наблюдаются достоверные различия: показатель стимулированного варианта НСТ-теста максимален при ХО без заболеваний ГБС, при наличии заболеваний ГБС он снижается, но остается достоверно выше значений контрольной группы. Это может быть связано с истощением резервных возможностей бактерицидных систем нейтрофилов у паци-

Таблица. Иммунологические показатели пациентов с ХО и контрольной группы [Me (Q_{25}–Q_{75})]

Table. Immunological parameters of patients with CS and control subjects [Me (Q_{25}–Q_{75})]

Показатели Indicators	**КГ** | KG **n = 50**	**ХО без ЗГБС** | CO without DHS **n = 21**	**ХО с ЗГБС** | CO with DHS **n = 57**
МП нейтрофилов, у.е. | Neutrophil MP, c.u.	261 (139–456)	782* (421–965)	749* (509–1184)
ФАН, % | PAN, %	76 (65–80)	84*(77–89)	82* (74–86)
НСТ спонтанный, % | NBT spontaneous, %	7,5 (2–11)	20* (15–25)	17* (14–24)
НСТ стимулированный, % | NBT stimulated, %	23 (15–29)	42*(34–50)	37* ** (31–45)
Лимфоциты, % | Lymphocytes, %	34 (31–37)	32 (26–38)	30* (26–36)
Лимфоциты, кл/мкл | Lymphocytes, cell/ml	2046 (1666–2212)	1800 (1558–2032)	1716* (1376–2053)
CD3, кл/мкл | CD3, cell/ml	1411 (1297–1727)	1310 (1194–1510)	1292* (1060–1558)
CD8, %	28 (23–33)	22* (17–29)	25* (21–31)
CD8, кл/мкл | CD8, cell/ml	570 (416–727)	383* (298–527)	437* (313–573)
CD19, кл/мкл | CD19, cell/ml	216 (167–284)	179 (130–266)	153* (116–240)
IgE, МЕ/мл | IgE, IU/ml	8 (4–19)	12 (2–21)*	20* ** (9–90)
IL-8, пг/мл | IL-8, pg/ml	6,5 (5–15)	1* (0,2–3)	13* ** (3–204)

Примечание. Приведены значения только тех показателей, по которым тест Краскела–Уоллиса выявил статистически значимые различия между группами. * — отличие от КГ, ** — различия между группами ХО, статистически значимые по критерию U Манна–Уитни с поправкой Бонферрони.

Note. Showing only those with significant inter-group differences according to Kruskal–Wallis test. * — difference from KG, ** — differences between the groups of CO, significant according to the U Mann-Whitney criterion with Bonferroni correction.

ентов с симптомами поражения гепатобилиарной системы из-за длительно протекающего воспаления.

Клеточное звено адаптивного иммунного ответа инвазированных *Opisthorhis felineus* характеризуется дисбалансом популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов [4, 6, 8]. В нашем исследовании показатели клеточного звена у пациентов с хронической описторхозной инвазией без клинических проявлений заболеваний гепатобилиарной системы демонстрируют снижение абсолютного и относительного количества цитотоксических Т-лимфоцитов. В группе с клиникой поражения гепатобилиарной системы выявляется еще более глубокий дисбаланс показателей: снижено относительное и абсолютное количество лимфоцитов, абсолютное количество Т-лимфоцитов, относительное и абсолютное количество цитотоксических Т-лимфоцитов, что может указывать на вовлечение клеточного иммунитета в патогенез осложнений ХО.

В исследованиях гуморального звена иммунного ответа обнаружена его активация при ХО [8]. У всех обследованных нами пациентов с ХО также активирован гуморальный иммунный ответ — значительно повышен уровень IgE, при этом у пациентов с клиникой поражения ГБС этот показатель еще более возрастает и выявляется снижение В-лимфоцитов.

Таким образом, у пациентов с хронической описторхозной инвазией при клинически выраженных поражениях органов гепатобилиарной системы существенно изменяются иммунологические показатели врожденного и гуморального звена иммунитета. В частности отмечается повышенный уровень IgE, который имеет очень важное значение в процессе формирования противопаразитарного иммунитета, запуская цепь процессов взаимодействия эозинофилов с гельминтами [1] и коррелирует с тяжестью патологического процесса. У этих пациентов отмечается также повышенный уровень провоспалительного цитокина IL-8, важнейшей биологической функцией которого является высочайшая активность хемоаттрактанта для нейтрофилов, базофилов и Т-лимфоцитов. IL-8 вызывает экспрессию молекул клеточной адгезии, тем самым усиливая прилипание нейтрофилов к эндотелиальным клеткам (с последующей их экстравазацией), что обусловливает его основную роль в опосредовании воспалительного ответа [3]. Полученные данные свидетельствуют о вовлечении всех звеньев иммунного ответа в выраженный воспалительный процесс при осложнении ХО клинически выраженными заболеваниями ГБС, а также об истощении резервных возможностей бактерицидных систем нейтрофилов у пациентов с симптомами поражения ГБС.

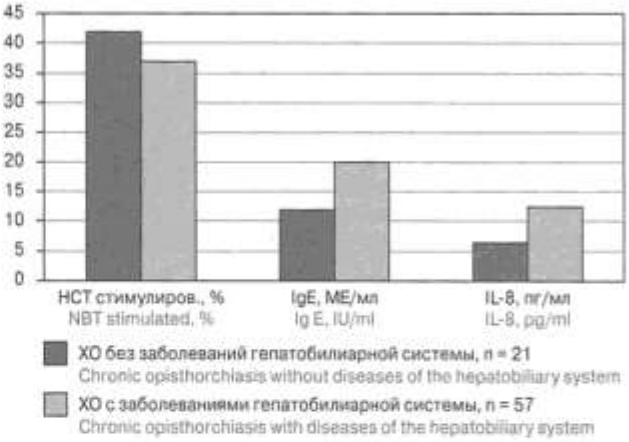


Рисунок. Статистически значимые различия иммунологических показателей между группами пациентов с описторхозом (Me)

Figure. Significant differences in immunological parameters between groups of patients with opisthorchiasis (Me)

Примечание. Оценка значимости различий между группами проводилась с помощью теста Краскела–Уоллиса, при выявлении значимых различий проводили попарные сравнения с помощью непараметрического критерия U Манна–Уитни с поправкой Бонферрони.

Note. The significance of the differences between the groups was assessed using the Kruskal–Wallis test, and when significant differences were identified, pairwise comparisons were performed using the nonparametric U Mann–Whitney criterion with Bonferroni correction.

Список литературы/References

1. Бакштановская И.В., Степанова К.Б., Кальгина Г.А., Степанова Т.Ф Взаимосвязи биохимических и иммунологических показателей у больных хроническим описторхозом // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2018. № 1. С. 13–19. [Bakshtanovskaya I.V., Stepanova K.B., Kalgina G.A., Stepanova T.F. Relationships between biochemical parametrs in patients chronic opistorchiasis. *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni = Medical Parasitology and Parasitic Diseases, 2018, no. 1, pp. 13–19. (In Russ.)*]
2. Белозеров Е.С., Шувалова Е.П. Описторхоз. М.: Медицина, 1981. 128 с. [Belozerov E.S., Shuvalova E.P. Opisthorchiasis. *Moscow: Medicine, 1981, 128 p. (In Russ.)*]
3. Ешмолов С.Н., Ситников И.Г., Мельникова И.М. Цитокины ФНО-α, ИФН-γ, ИЛ-1, ИЛ-4, ИЛ-8 и их роль в иммунном ответе при инфекционном поражении ЦНС у детей // Детские инфекции. 2018. Т. 17, № 1. С. 17–22. [Eshmolov S.N., Sitnikov I.G., Melnikova I.M. The role of cytokines TNF-α, IFN-γ, IL-1, IL-4, IL-8 in the immune response in infectious lesions of cns in children. *Detskie infektsii = Children Infections, 2018, vol. 17, no. 1, pp. 17–22. (In Russ.)*] *doi: 10.22627/2072-8107-2018-17-1-17-22*

4. Ильинских Е.Н., Ильинских Н.Н., Ильинских И.Н., Лепехин А.В., Юркин А.Ю., Бужак Н.С. Характеристика клеточного иммунного ответа в зависимости от интенсивности инвазии у больных хроническим описторхозом // Бюллетень сибирской медицины. 2010. Т. 9, № 1. С. 40–44. [Ilyinskikh Y.N., Ilyinskikh N.N., Ilyinskikh I.N., Lepyokhin A.V., Yurkin A.Yu., Buzhak N.S. Characterization of cellular immune response associated with infection intensity in chronic opisthorchiasis patients. *Byulleten' sibirskoi meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine. 2010, vol. 9, no. 1, pp. 40–44. (In Russ.)*] *doi: 10.20538/1682-0363-2010-1-40-44*
5. Кальгина Г.А., Степанова К.Б., Степанова Т.Ф., Григорьева С.А., Курлаева Л.В., Фадеева Н.В. Неспецифическая резистентность у пациентов с хронической описторхозной инвазией в Тюменской области // Важнейшие вопросы инфекционных и паразитарных болезней: пятый сб. науч. работ. Тюмень, 2017. С. 53–55. [Kalgina G.A., Stepanova K.B., Stepanova T.F., Grigorieva S.A., Kurlaeva L.V., Fadeeva N.V. Nonspecific resistance in patients with chronic opisthorchiasis invasion in the Tyumen region. The most important issues of infectious and parasitic diseases: Fifth collection of scientific papers. *Tyumen, 2017, pp. 53–55. (In Russ.)*]
6. Курлаева Л.В., Степанова Т.Ф., Степанова К.Б., Кальгина Г.А., Григорьева С.А. Основные показатели клеточного иммунитета при хроническом описторхозе у лиц, проживающих на территории Тюменской области // Важнейшие вопросы инфекционных и паразитарных болезней: шестой сб. науч. работ. Ижевск: ООО «Принт», 2018. С. 67–69. [Kurlaeva L.V., Stepanova T.F., Stepanova K.B., Kalgina G.A., Grigorieva S.A. The main indicators of cellular immunity in chronic opisthorchiasis in people living in the Tyumen region. The most important issues of infectious and parasitic diseases: Sixth collection of scientific papers. *Izhevsk: Print LLC, 2018, pp. 67–69. (In Russ.)*]
7. Меньшиков И.В., Бедулева Л.В. Основы иммунологии: лабораторный практикум. Ижевск: Удмуртский университет, 2001. 133 с. [Menshikov I.V., Beduleva L.V. Foundations of Immunology. Laboratory Workshop. *Izhevsk: Udmurt University, 2001. 133 p. (In Russ.)*]
8. Москаленко О.Л., Филимонова Л.А., Яскевич Р.А. Изменения иммунологических показателей у больных хроническим описторхозом с клиникой поражения гепатобилиарной системы // Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture, 2019, Т. 11, № 5-2. С. 90–94. [Moskalenko O.L., Filimonova L.A., Yaskevich R.A. Changes of immunological indices in patients with chronic opisthorchiasis with the clinic of lesions of the hepatobiliary system. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture, 2019, vol. 11, no. 5-2, pp. 90–94. (In Russ.)*] *doi: 10.12731/2658-6649-2019-11-5-2-90-94*
9. Степанова Т.Ф. Описторхоз: новый взгляд на инвазионную болезнь, основы клинической реабилитации, методологию крупномасштабных оздоровительных работ. Тюмень: Изд-во ТГУ, 2002. 196 с. [Stepanova T.F. Opisthorchiasis: new views on invasive disease, the basics of clinical rehabilitation, the methodology of large-scale recreational work. *Tyumen: Tyumen State University, 2002. 196 p. (In Russ.)*]
10. Филимонова Л.А., Борисенко Т.А. Описторхоз, клинические проявления // Сибирское медицинское обозрение. 2006. Т. 39, № 2. [Filimonova L.A., Borisenko T.A. Opisthorchiasis, clinical. *Siberian Medical Review, 2006, vol. 39, no. 2. (In Russ.)*]
11. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Истамов Х.И. Методические рекомендации по оценке иммунного статуса человека. В кн.: Экологическая иммунология. М.: Изд-во ВНИРО, 1995. С. 126–127. [Khaitov R.M., Pinegin B.V., Istamov H.I. Methodical recommendations for evaluation of human immune status. In: Ecological Immunology. *Moscow: Publishing house VNIRO, 1995, pp. 126–127. (In Russ.)*]
12. Pakharukova M.Y., Zaparina O.G., Kapushchak Y.K., Baginskaya N.V., Mordvinov V.A. Opisthorchis felineus infection provokes time-dependent accumulation of oxidative hepatobiliary lesions in the injured hamster liver. *PLoS One, 2019, vol. 14, no. 5: e0216757. doi: 10.1016/j.ijpara.2019.11.007*
13. Salao K., Spofford E.M., Price C., Mairiang E., Suttiprap S., Wright H.L., Sripa B., Enhanced E. Neutrophil functions during Opisthorchis viverrini infections and correlation with advanced periductal fibrosis. *Int. J. Parasitol., 2020, vol. 50, no. 2, pp. 145–152. doi: 10.1016/j.parint.2016.11.017*
14. Yurlova N.I., Yadrenkina E.N., Rastyazhenko N.M., Serbina E.A., Glupov V.V. Opisthorchiasis in Western Siberia: epidemiology and distribution in human, fish, snail, and animal populations. *Parasitol. Int., 2017, vol. 66, no. 4, pp. 355–364. doi: 10.1371/journal.pone.0216757*

Авторы:

Григорьева С.А., научный сотрудник группы клинической и экспериментальной иммунологии ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия;
Степанова К.Б., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клиники и иммунологии биогельминтозов ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия;
Степанова Т.Ф., д.м.н., профессор, директор ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия;
Кальгина Г.А., к.б.н., ведущий научный сотрудник группы клинической и экспериментальной иммунологии ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия;
Курлаева Л.В., младший научный сотрудник группы клинической и экспериментальной иммунологии ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия.

Authors:

Grigorieva S.A., Researcher, Clinical and Experimental Immunology Group, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation;
Stepanova K.B., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Clinics and Immunology of Biohelminthiasis, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation;
Stepanova T.F., DSc (Medicine), Professor, Director, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation;
Kalgina G.A., PhD (Biology), Leading Researcher, Clinical and Experimental Immunology Group, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation;
Kurlaeva L.V., Junior Researcher, Clinical and Experimental Immunology Group, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation.

Поступила в редакцию 15.12.2022
Принята к печати 09.03.2023

Received 15.12.2022
Accepted 09.03.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 2, pp. 369–375

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 2, с. 369–375

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ПОВЫШЕНИЯ КАЧЕСТВА РЕЗУЛЬТАТОВ УСКОРЕННОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ГЕМОКУЛЬТУР

А.В. Халиулин, А.В. Лямин, О.А. Гусякова, Д.В. Алексеев, В.М. Степанов

Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия

Резюме. Диагностика инфекций кровотока по-прежнему остаются актуальной проблемой современной медицины. Основными возбудителями септических состояний являются грамположительные микроорганизмы, в частности золотистый стафилококк, энтерококки и др., в то время как клиническое значение выделения коагулазонегативных стафилококков неоднозначно. Среди грамнегативной флоры превалируют *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae* и другие энтеробактерии, а также *Acinetobacter baumannii*. Современные возможности ускоренной идентификации микроорганизмов из положительных гемокультур, которые основаны на масс-спектрометрии, складываются из двух подходов. Во-первых, предложены разработки фирм-производителей расходных материалов для масс-спектрометрии, во-вторых, имеются «местные» варианты ускоренных протоколов пробоподготовки, использующиеся микробиологическими лабораториями. Используемые подходы имеют ряд достоинств и недостатков, однако если их резюмировать, то использование предложенных методик в рутинной практике оказывается достаточно ограниченным. При этом потребность в ускорении выдачи микробиологического заключения для данной нозологии велика и ассоциирована с улучшением исходов. В связи с этим целью исследования было оценить сходимость и точность результатов ускоренной идентификации микроорганизмов из положительных гемокультур при инфекциях кровотока. В исследовании было включено 87 положительных гемокультур, идентификация патогенов в них происходила четырьмя способами: классическое микробиологическое исследование крови на стерильность, идентификация патогена напрямую из флакона без выделения чистой культуры, а так же две методики пробоподготовки, основанные на использовании этилендиаминотетрауксусной кислоты (ЭДТУК) и этилендиаминотетраацетата калия двузамещенного (ЭДТА-К2) в качестве отмывочных добавок. Было обнаружено, что грампозитивная и грамнегативная флора выделялась из крови с примерно одинаковой частой. При оценке влияния биоматериала используемого для масс-спектрометрии, оказалось, что использование отмывочных добавок увеличивает шансы успешной идентификации бактерий из образца крови. Также было оценено влияние тинкториальных свойств на результаты определения видовой принадлежности изолятов. Идентификация грамположительной флоры оказывается более точной, так как часть патогенов без отмывочных добавок не идентифицировалась, а при использовании ЭДТА-К2 и соответствующей кислоты в этих же образцах удалось идентифицировать патогены до рода. Подобная закономерность была характерна и для грамотрицательной флоры. Вместе с тем современные производители лабораторного оборудования и реагентов позволяют стандартизировать процедуры пробоподготовки в используемых протоколах. Эффекты ЭДТА-К2, позволяющие использовать

Адрес для переписки:
Халиулин Алмаз Вадимович
443099, Россия, г. Самара, ул. Чапаевская, 89,
Самарский государственный медицинский университет.
Тел.: 8 (846) 337-04-63.
E-mail: a.v.haliulin@samsmu.ru

Contacts:
Almaz V. Khaliulin
443079, Russian Federation, Samara, Chapaevskaya str., 89,
Samara State Medical University.
Phone: +7 (846) 337-04-63.
E-mail: a.v.haliulin@samsmu.ru

Для цитирования:
Халиулин А.В., Лямин А.В., Гусякова О.А., Алексеев Д.В., Степанов В.М. Оценка возможности повышения качества результатов ускоренной идентификации микроорганизмов из положительных гемокультур // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 2. С. 369–375. doi: 10.15789/2220-7619-AAP-2028

Citation:
Khaliulin A.V., Lyamin A.V., Gusyakova O.A., Alekseev D.V., Stepanov V.M. Assessing a potential to improve data quality for accelerated identification of microorganisms derived from positive blood cultures // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 2, pp. 369–375. doi: 10.15789/2220-7619-AAP-2028

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-AAP-2028

ее в качестве компонента отмывки, связаны со связыванием ионов кальция и магния в растворе, что снижает адгезию бактериальных клеток к клеткам крови, тем самым способствуя более качественной масс-спектрометрии микробных осадков при ускоренной идентификации микроорганизмов из положительных гемокультур. Таким образом, использование описанных добавок может обеспечивать качественную, своевременную и адекватную диагностику таких серьезных и жизнеугрожающих состояний как инфекции кровотока.

Ключевые слова: *пробоподготовка, ускоренная идентификация, инфекции кровотока, бактериемия, биоматериал, центрифугирование.*

ASSESSING A POTENTIAL TO IMPROVE DATA QUALITY FOR ACCELERATED IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS DERIVED FROM POSITIVE BLOOD CULTURES

Khaliulin A.V., Lyamin A.V., Gusyakova O.A., Alekseev D.V., Stepanov V.M.

Samara State Medical University of MH RF, Samara, Russian Federation

Abstract. Diagnostics of blood-borne infections is still an urgent problem of modern medicine. The main causative agents of septic conditions are gram-positive microorganisms particularly *Staphylococcus aureus*, enterococci, etc., whereas clinical significance of isolated coagulase-negative staphylococci is ambiguous. *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae* and other enterobacteria, as well as *Acinetobacter baumannii* prevail among the gram-negative flora. Modern possibilities of accelerated identification of microorganisms derived from positive blood cultures based on mass-spectrometry consist of two approaches. Firstly, the manufacturers' developed consumables for mass spectrometry are proposed, and secondly, there are "domestic" developments of accelerated sample preparation protocols developed by microbiological laboratories. The approaches used have a number of advantages and disadvantages, but to summarize, the use of the proposed methods in routine practice is quite limited. At the same time, the need to accelerate the issuing a microbiological conclusion related to nosology is great being associated with improved outcomes. In this regard, the aim of the study was to evaluate convergence and accuracy of results for accelerated identification of microorganisms derived from positive blood cultures in blood-borne infections. The study included 87 positive blood cultures, the identification of pathogens from them occurred in four ways: the classical microbiological analysis of blood for sterility, pathogen identification directly from the vial without isolating a pure culture, as well as two sample preparation methods based on ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and potassium ethylenediaminetetraacetate disubstituted (EDTA-K2) as wash additives. It was found that gram-positive and gram-negative flora were isolated from the blood almost evenly often. When evaluating an influence of biomaterial used for mass spectrometry, it turned out that use of wash additives increases chances of successful identification of bacteria from a blood sample. The influence of tinctorial properties on the results of determining the species assignment of isolates was also evaluated. Identification of gram-positive flora is more accurate, since some pathogens were not identified without washing additives, and when using EDTA-K2 and the corresponding acid, assignment to the genus was obtained in the same samples. A similar pattern was also characteristic of gram-negative flora. At the same time, modern manufacturers of laboratory equipment and reagents allow to standardize sample preparation procedures in the protocols used. The effects of EDTA-K2, which allowing to use it as a washing component, are associated with the binding of calcium and magnesium ions in solution, which reduces the adhesion of bacterial cells to blood cells, thereby contributing to better mass spectrometry of microbial sediments with accelerated identification of microorganisms from positive blood cultures. Thus, use of the described additives can provide high quality, timely and adequate diagnostics of serious and life-threatening conditions such as blood-borne infections.

Key words: *sample preparation, rapid identification, bloodstream infections, bacteremia, biomaterial, centrifugation.*

Введение

Инфекции кровотока по-прежнему характеризуются высокой смертностью в структуре инфекционной патологии [2]. Среди грамотрицательных возбудителей септических состояний наиболее часто выделяются *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii*, а среди грамположительной флоры наиболее часто идентифицируются *Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium*, у детей особую этиологическую роль играет *Streptococcus agalactiae*. Отдельно следует отметить, что диагностическая значимость выделения коагулазонегативных стафилококков дискутабельна, и наиболее часто выделение представителей данной группы микроорганизмов указывает на возможную контаминацию пробы кожной микрофлорой [1]. По данным литературы, грибы редко вызывают инфекции кровотока и, в подавляющем большинстве, фунгемия обусловлена представителями рода *Candida*.

Имеющиеся на данный момент подходы к идентификации микроорганизмов из поло-

жительных гемокультур складываются из двух основных направлений: микробиологические лаборатории могут использовать коммерческие наборы, разработанные с учетом процедур валидации и верификации, а также множество разнообразных «домашних» протоколов пробоподготовки, разработанных специалистами «на местах» для последующей идентифкации патогенов. К первой группе методов могут быть отнесены наборы Sepsityperkit® и RapidSepsityper® (Bruker Daltonics, Германия), набор для посева крови Vitek MS® (bioMérieux, Франция), набор RapidBACpro® II (NittoboMedicalCo., Япония) [5, 10]. Внутренние протоколы лабораторий характеризуются разнообразием используемых технологий, которые могут включать: применение разных режимов центрифугирования, использование пробирок с разделительным гелем, а также различных добавок для лизиса компонентов крови и клеточного детрита, например сапонин, додецилсульфат, тритон X-100, хлорид аммония, трифторуксусная кислота [6, 15]. Обобщая описанные работы, можно заключить, что если протокол прост и не трудоемок, то частота идентификаций остается невысокой — в пределах 50–70%, в то время как более эффективные методики (80–90% успешных случаев идентификации) требуют больше времени и специальных реагентов, что ограничивает их использование в рутинной микробиологической практике.

Улучшение выживаемости при развитии инфекций кровотока обусловлено ранним назначением этиотропной антибактериальной или противогрибковой терапии [8]. В связи с этим актуальными остаются разработки простых и удобных методов ускоренной идентификации патогенов, в том числе с определением чувствительности к антибактериальным препаратам.

Цель исследования — оценка сходимости и точности результатов разных протоколов пробоподготовки при ускоренной идентификации микроорганизмов, выделенных из положительных гемокультур при инфекциях кровотока, при использовании разных отмывочных растворов.

Материалы и методы

В исследование включено 87 положительных гемокультур, полученных при использовании автоматического микробиологического анализатора Юнона LABSTAR 100» (SCENKER, Китай). Идентификация патогенов проводилась 4 способами: I способ — выделение чистой культуры микроорганизма на коммерческих универсальных питательных средах (классическое микробиологическое исследование крови на стерильность); II способ — идентификация из положительной гемокультуры без выделения чистой культуры из микробного осадка [4]; III способ — 4 мл крови из положительной гемокультуры помещали в пробирку с разделительным гелем, туда же добавляли 1 мл 5% этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТУК); IV способ — 4 мл крови из положительной гемокультуры помещали в пробирку с разделительным гелем и этилендиаминтетраацетатом калия двузамещенным (ЭДТА-К2). Далее проводились идентичные действия с пробирками ЭДТУК и ЭДТА-К2. Центрифугировали при 1000g в течение 12 мин, сливали надосадок. Отмывали осадок 1,5–2,0 мл 0,9% хлорида натрия, отбирали 1,0 мл суспензии, далее центрифугировали при 100g 3 мин, отбирали строго 700 мкл надосадка и центрифугировали его при 10 000g 2 мин, удаляли надосадок, далее добавляли по 25–40 мкл ацетонитрила и 70% муравьиной кислоты (в зависимости от величины осадка), ресуспензировали, центрифугировали при 10 000g 2 мин, удаляли надосадок и на мишень для масс-спектрометрии стерильной петлей наносили материал с осадка, высушивали на воздухе, покрывали матрицей (α-циано-4-гидроксикоричная кислота). Масс-спектрометрию проводили на приборе Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия) в режиме Sepsityper, согласно инструкции производителя. Видовая идентификации достигалась при score более 1,800, родовая идентификация при значении 1,600–1,7999, а при значении показателя 0–1,599 идентификация считалась неудачной. В качестве отрицательного контроля использовали раствор матрицы, положительного контроля — штамм кишечной палочки Американской коллекции типовых культур *Escherichia coli* (ATCC 25922). Исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО «ЮУГМУ Минздрава России» (протокол № 9 от 04.12.2021).

Группировку данных и вычисления проводили с использованием пакета программ MicrosoftExcel® 2013. Статистический анализ проводился с использованием программы StatTech v. 2.8.7 (разработчик — ООО «Статтех», Россия). Категориальные данные описывались с указанием процентных долей. Сравнение процентных долей при анализе четырехпольных таблиц сопряженности выполнялось с помощью, критерия хи-квадрат Пирсона (при значениях ожидаемого явления более 10).

Результаты и обсуждение

При идентификации микроорганизмов классической методикой было выявлено следующее распределение патогенов: отмечается незначительное преобладание частоты выделения

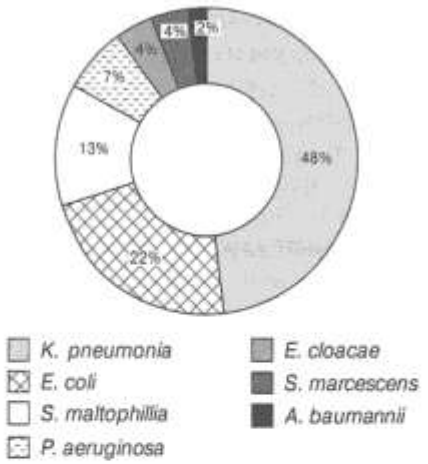


Рисунок 1. Видовое разнообразие грамотрицательной флоры, выделенной из крови пациентов

Figure 1. Species diversity of gram-negative flora isolated from patient blood

грамотрицательной флоры из образцов (53%), 47% заняли представители грамположительной флоры. Среди грамположительных микроорганизмов в подавляющем большинстве случаев выделялся *Staphylococcus epidermidis*, реже выявлялись *S. aureus* и *Staphylococcus haemolyticus*. Редкими изолятами были *E. faecalis*, а также представители рода *Corynebacterium*.

Грамотрицательные микроорганизмы в нашем исследовании характеризовались большим видовым разнообразием (рис. 1).

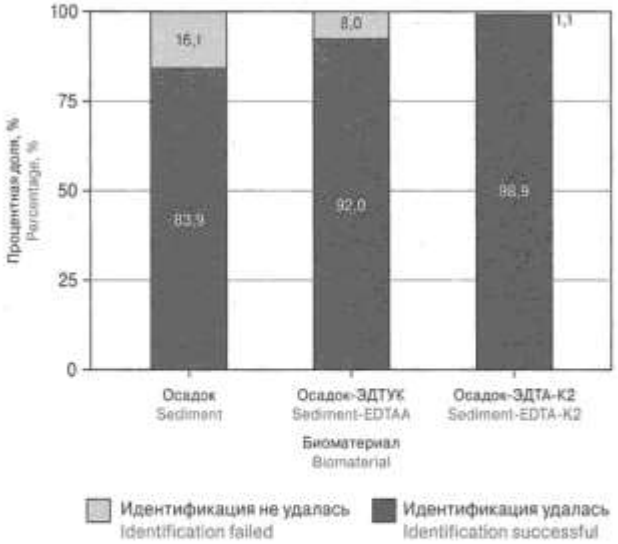


Рисунок 2. Анализ частоты успешной идентификации в зависимости от биоматериала для масс-спектрометрии

Figure 2. Analysis of frequency of successful identification depending on biomaterial used for mass spectrometry

На первом этапе нами был выполнен анализ частоты успешной идентификации в зависимости от биоматериала (рис. 2).

Исходя из полученных данных при оценке идентификации в зависимости от биоматериала, нами были установлены статистически значимые различия ($p = 0,002$). Таким образом, использование ЭДТА-К2 способствует увеличению частоты идентификации микроорганизмов из положительной гемокультуры.

С целью уточнения того, результат идентификации каких микроорганизмов улучшился, мы провели анализ зависимости точности идентификации от исследуемого материала и тинкториальных свойств микроорганизмов (табл.).

Согласно полученным данным, при сопоставлении точности идентификации и тинкториальных свойств в зависимости от материала были установлены существенные различия ($p = 0,015$). Выявлено, что при использовании осадка микробов в качестве материала для масс-спектрометрии приемлемый результат идентификации не был получен в 16,1% случаев, в то время как использование отмывочных растворов позволяет более точно определить принадлежность патогена к определенным таксономическим группам: в группе грамположительных микроорганизмовне были идентифицированы 6,9% образцов, в то время как при использовании отмывочных растворов доля неудавшихся идентификаций уменьшилась, а доля родовой и видовой идентификации увеличилась. Для грамотрицательной флоры были получены аналогичные результаты. При этом достоверных различий в результатах идентификации при сравнении групп ЭДТУК и ЭДТА-К обнаружено не было.

Обсуждение

В представленной выборке распределение микрофлоры по тинкториальным свойствам при окраске по методу Грама оказалось следующим: примерно поровну для каждой из групп микроорганизмов.

Результаты оценки факторов преаналитического этапа (в частности выбор протоколов пробоподготовки) показали их приоритетное влияние на качество результата идентификации микроорганизмов. В научной литературе имеются данные о сложностях, связанных с масс-спектрометрией грамположительных микроорганизмов, что может быть связано с отличным от грамотрицательной флоры строением бактериальной стенки. В частности, большинство протоколов ускоренной идентификации микроорганизмов из положительных гемокультур основаны на экстракции микросомальных белков

Таблица. Анализ точности идентификации в зависимости от биоматериала и тинкториальных свойств
Table. Analysis of the accuracy of determination depending on the biomaterial and tinctorial properties

	Точность идентификации Accuracy of identification	**Биоматериал** Biomaterial			**p**
		Осадок, % Pellet, %	**Осадок-ЭДТУК, %** Pellet-EDTA, %	**Осадок-ЭДТА-К2, %** Pellet-EDTA-K2, %	
Грамположительные микроорганизмы, n = 47 Gram-positive microorganisms, n = 47	**Видовая** Species	37,9	33,3	39,1	0,015* $p_{Осадок-Осадок\text{-}ЭДТА\text{-}К2}$ = 0,012
	Родовая Genus	1,1	10,3	5,7	
	Идентифкация не прошла Failed	6,9	2,3	1,1	
Грамотрицательные микроорганизм, n = 40 Gram-negative microorganisms, n = 40	**Видовая** Species	41,4	40,2	43,7	
	Родовая Genus	3,4	8,0	10,3	
	Идентифкация не прошла Failed	9,2	5,7	0,0	

Примечание. * — различия показателей статистически значимы ($p < 0,05$).
Note. * — significant differences ($p < 0.05$).

из бактериальных клеток, что может обуславливать ограничения в идентификации грамположительных микробов в силу мощного слоя пептидогликанов, препятствующего выходу белков из цитоплазмы бактерии. Наш протокол предполагает сравнение двух отмывочных добавок: 5% раствор ЭДТУК и ЭДТА-К2. Оказалось, что использование отмывки увеличивает долю идентификации грамположительных патогенов, что связано с конкуренцией ЭДТУК и ЭДТА-К2 за ионы кальция и магния, которые требуются микробным клеткам для адгезии между собой и клетками крови, прежде всего эритроцитами [11]. Подобный эффект описан для моно-, ди- и тринатриевой соли ЭДТУК, однако, как видно из нашей работы, он характерен и для дикалиевой соли ЭДТА. Согласно литературным данным, описано действие солей и собственно ЭДТУК на грамположительную, грамотрицательную микрофлору, грибы и амебы [7]. Грамотрицательная флора требует присутствия двухвалентных катионов, таких как Mg^{2+} и Ca^{2+}, для стабилизации отрицательно заряженных участков олигосахаридных цепей липополисахаридной стенки. При этом ЭДТА способна удалять катионы из внешнего листка липополисахаридов, обнажая фосфолипиды цитоплазматической мембраны, что увеличивает ее нестабильность [7]. В случае грамположительной флоры механизм действия ЭДТА основан на следующем: в физиологических условиях у микроорганизмов присутствует семейство цистеиновых транспептидаз — сортаз, ответственных за перенос пептидных остовов на поверхность мембраны, для построения пилей, которые обеспечивают адгезию бактериальной клетки к клеткам организма-хозяина. Кроме этого, сортазы способны сортировать пептиды по бактериальной стенке и «пришивать» их к ней. При этом отмечено, что данные молекулярные структуры не являются жизненно необходимыми для роста и размножения бактериальных клеток, однако они формируют значительный вирулентный потенциал данной группы микроорганизмов [3]. Важно отметить, что грампозитивные микроорганизмы различаются количеством сортаз, количеством пилиновых остовов, необходимых для построения пилей, классом сортаз, а также типами пептидов, транспортируемых к клеточной стенке и акцепторными участками на поверхности бактериальной стенки [13]. Описано, что аллостерическим активатором сортазы типа А, характерной для золотистого стафилококка, являются ионы Ca^{2+}, которые способствуют увеличению активности синтеза пилей и облегчают распознавание сортазами специфических субстратов. Таким образом, логичным представляется эффект ЭДТА в описанном протоколе пробоподготовки, который нивелирует активирующее действие катионов и уменьшает адгезию грамположительной флоры к клеткам крови, что в итоге способствует увеличению микробной массы в конечном материале для масс-спектрометрии, а это, в свою очередь, повышает долю «успешных» идентификаций патогенных микроорганизмов [9]. Различные соли ЭДТА используются в клинической практике с целью уменьшения

образования биопленок в стоматологии, хирургии, а также как потенциирующее средство с рядом антимикробных химиопрепаратов [12, 14].

Результаты наших исследований показали, что статистически достоверной разницы в частоте успешной идентификации микроорганизмов при использовании собственно этилендиаминтетрауксусной кислоты и ЭДТА-К2 не обнаружено, однако с точки зрения трудоемкости и стандартизации методики предпочтение отдается использованию дикалиевой соли ЭДТА, которая доступна как компонент в виде готовых вакуумных пробирок.

Таким образом, проблемы недостаточно успешной идентификации грампозитивной флоры из положительных гемокультур можно решить при использовании известных, доказанных явлений, но в несколько новом «прочтении». Это может способствовать более качественной, своевременной и адекватной диагностике таких серьезных и жизнеугрожающих состояний как инфекции кровотока.

Список литературы/References

1. Гумилевский Б.Ю., Котив Б.Н., Орлова Е.С., Суборова Т.Н., Иванов Ф.В., Сидельникова О.П., Шуклина А.А. Характеристика спектра и чувствительности к антибиотикам бактерий, выделенных из крови пациентов многопрофильной военно-медицинской организации // Вестник новых медицинских технологий. 2022. Т. 29, № 2. С. 32–37. [Gumilevskij B.Ju., Kotiv B.N., Orlova E.S., Suborova T.N., Ivanov F.V., Sidel'nikova O.P., Shuklina A.A. Characteristics of the spectrum and sensitivity to antibiotics of bacteria isolated from the blood of patients of a multidisciplinary military medical organization. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologii = Journal of New Medical Technologies, vol. 29, no. 2, pp. 32–37. (In Russ.)*] *doi: 10.24412/1609-2163-2022-2-32-37*
2. Козлов И.А., Овезов А.М., Раутбарт С.А., Тюрин И.Н., Александровский А.А., Скрипкин Ю.В. Анализ ранних факторов риска летального исхода абдоминального сепсиса как показаний к началу инвазивного мониторинга центральной гемодинамики: ретроспективное обсервационное исследование // Вестник интенсивной терапии им. А.И. Салтанова. 2022. № 2. С. 70–79. [Kozlov I.A., Ovezov A.M., Rautbart S.A., Tjurin I.N., Aleksandrovskij A.A., Skripkin Ju.V. Analysis of heart attack risk of fatal abdominal sepsis as indicated in the initial phase of invasive hemodynamic monitoring: a retrospective observational study. *Vestnik intensivnoi terapii im. A.I. Saltanova = Annals of Critical Care, no. 2, pp. 70–79. (In Russ.)*] *doi: 10.21320/1818-474X-2022-2-70-79*
3. Петухова И.Н., Дмитриева Н.В., Григорьевская З.В., Багирова Н.С., Терещенко И.В. Инфекции, связанные с образованием биопленок // Злокачественные опухоли. 2019. Т. 9, № 3s1. С. 26–31. [Petuhova I.N., Dmitrieva N.V., Grigor'evskaja Z.V., Bagirova N.S., Tereshhenko I.V. Infections associated with biofilm formation. *Zlokachestvennye opukholi = Malignant Tumoursis, 2019, vol. 9, no. 3s1, pp. 26–31. (In Russ.)*] *doi: 10.18027/2224-5057-2019-9-3s1-26-31*
4. Патент № 2766185 C1 Российская Федерация, МПК C12Q 1/04 (2006.01), G01N 33/48 (2006.01). Способ пробоподготовки для ускоренной идентификации микроорганизмов из положительных гематологических культур; № 2021121607; заявлено 20.07.2021: опубликовано 09.02.2022 / Халиулин А.В., Лямин А.В., Гусякова О.А., Козлов А.В., Балдина О.А.; Патентообладатель: Халиулин А.В. 8 с. [Patent No. 2766185 C1 Russian Federation, IPC C12Q 1/04 (2006.01), G01N 33/48 (2006.01). Sample preparation method for accelerated identification of microorganisms from positive hematological cultures: No. 2021121607; application: 07.20.2021; date of publication 02.09.2022 / Khaliulin A.V., Lyamin A.V., Gusyakova O.A., Kozlov A.V., Baldina O.A. Proprietor: Khaliulin A.V. 8 p.]
5. Ashizawa K., Murata S., Terada T., Ito D., Bunya M., Watanabe K., Teruuchi Y., Tsuchida S., Satoh M., Nishimura M., Matsushita K., Sugama Y., Nomura F. Applications of copolymer for rapid identification of bacteria in blood culture broths using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Microbiol. Methods, 2017, vol. 139, pp. 54–60. doi: 10.1016/j.mimet.2017.04.013*
6. Caspar Y., Garnaud C., Raykova M., Bailly S., Bidart M., Maubon D. Superiority of SDS lysis over saponin lysis for direct bacterial identification from positive blood culture bottle by MALDI-ToF MS. *Proteomics Clin. Appl., 2017, vol. 11, no. 5–6: 1600131 doi: 10.1002/prca.201600131*
7. Finnegan S., Percival S.L. EDTA: an antimicrobial and antibiofilm agent for use in wound care. *Adv. Wound Care, 2015, vol. 4, no. 7, pp. 415–421. doi: 10.1089/wound.2014.0577*
8. Kato H., Yoshimura Y., Suido Y., Shimizu H., Ide K., Sugiyama Y., Matsuno K., Nakajima H. Mortality and risk factor analysis for Candida blood stream infection: a multicenter study. *J. Infect. Chemother., 2019, vol. 25, no. 5, pp. 341–345. doi: 10.1016/j.jiac.2019.01.002*
9. Naik M.T., Suree N., Ilangovan U., Liew C.K., Thieu W., Campbell D.O., Clemens J.J., Jung M.E., Clubb R.T. Staphylococcus aureus sortase A transpeptidase. Calcium promotes sorting signal binding by altering the mobility and structure of an active site loop. *J. Biol. Chem., 2006, vol. 281, no. 3, pp. 1817–1826. doi: 10.1074/jbc.M506123200*
10. Ponderand L., Pavese P., Maubon D., Giraudon E., Girard T., Landelle C., Maurin M., Caspar Y. Evaluation of Rapid Sepsityper® protocol and specific MBT-Sepsityper module (Bruker Daltonics) for the rapid diagnosis of bacteremia and fungemia by MALDI-ToF-MS. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob., 2020, vol. 19, no. 1, pp. 60–75. doi: 10.1186/s12941-020-00403-w*
11. Schieffer K.M., Tan K.E., Stamper P.D., Somogyi A., Andrea S.B., Wakefield T., Romagnoli M., Chapin K.C., Wolk D.M., Carroll K.C. Multicenter evaluation of the Sepsityper™ extraction kit and MALDI-ToF MS for direct identification of positive blood culture isolates using the BD BACTEC™ FX and VersaTREK® diagnostic blood culture systems. *J. Appl. Microbiol., 2014, vol. 116, no. 4, pp. 934–941. doi: 10.1111/jam.12434*
12. Sharma M., Visai L., Bragheri F., Cristiani I., Gupta P.K., Speziale P. Toluidine blue-mediated photodynamic effects on staphylococcal biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother., 2008, vol. 52, no. 1, pp. 299–305. doi: 10.1128/AAC.00988-07*

13. Spirig T., Weiner E.M., Clubb R.T., Sortase enzymes in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol., 2011, vol. 82, no. 5., pp. 1044–1059. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07887.x*
14. Walsh S.E, Maillard J.Y., Russell A.D., Catrenich C.E., Charbonneau D.L., Bartolo R.G. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and-negative bacteria. *J. Appl. Microbiol., 2003, vol. 94, no. 2, pp. 240–247. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.01825.x*
15. Yuan Y., Wang J., Zhang J., Ma B., Gao S., Li Y., Wang S., Wang B., Zhang Q., Jing N. Evaluation of an optimized method to directly identify bacteria from positive blood cultures using MALDI-ToF mass spectrometry. *J. Clin. Lab. Anal., 2020, vol. 34: e23119. doi: 10.1002/jcla.23119*

Авторы:
Халиулин А.В., старший преподаватель кафедры фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;
Лямин А.В., д.м.н., доцент, профессор кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;
Гусякова О.А., д.м.н., доцент, зав. кафедрой фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;
Алексеев Д.В., студент института клинической медицины ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;
Степанов В.М., студент института клинической медицины ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;

Authors:
Khaliulin A.V., Senior Lecturer, Department of Fundamental and Clinical Biochemistry with Laboratory Diagnostics, Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, Russian Federation;
Lyamin A.V., DSc (Medicine), Associate Professor, Professor of the Department of General and Clinical Microbiology, Immunology and Allergology, Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, Russian Federation;
Gusyakova O.A., DSc (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Fundamental and Clinical Biochemistry with Laboratory Diagnostics, Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, Russian Federation;
Alekseev D.V., Student, Institute of Clinical Medicine, Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, Russian Federation;
Stepanov V.M., Student, Institute of Clinical Medicine, Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, Russian Federation.

Поступила в редакцию 13.09.2022
Отправлена на доработку 11.02.2023
Принята к печати 21.02.2023

Received 13.09.2022
Revision received 11.02.2023
Accepted 21.02.2023

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 2, с. 376–382

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 2, pp. 376–382

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ХРАНЕНИЯ НА СТАБИЛЬНОСТЬ ХАНТАВИРУСНЫХ ВАКЦИННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ВИРУСА ПУУМАЛА

А.Н. Ветрова[1,2], С.С. Курашова[1], Р.Д. Теодорович[1], Ю.В. Попова[1], Е.А. Блинова[3], П.А. Набатников[1], Е.А. Ткаченко[1], Т.К. Дзагурова[1]

[1] *ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия*
[2] *ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия*
[3] *ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия*

Резюме. Стабильность цельновирионных инактивированных вакцин в значительной степени зависит от формуляции готового препарата. В данном исследовании изучалось влияние на сохранность иммуногенных свойств экспериментального вакцинного препарата против геморрагической лихорадки с почечным синдромом условий хранения вакцинного полуфабриката и использование в составе вакцины человеческого сывороточного альбумина, широко использующегося в качестве криопротектора. Для получения экспериментальной вакцины вирус Пуумала, размноженный в культуре клеток Vero, был сконцентрирован, инактивирован бета-пропиолактоном в разведении 1:6000 и очищен хроматографически на мультимодальном сорбенте Capto™Core 700 (GE Healthcare, США). Содержание целевого компонента в вакцинном препарате составило $2\pm0{,}2 \times 10^6$ копий РНК/мл. Гуморальный иммунный ответ на введение вакцинного препарата определяли по индукции нейтрализующих антител в сыворотках крови иммунизированных сирийских хомяков *(Mesocricetus auratus)*. Установлено, что инактивированный бета-пропиолактоном вирус Пуумала индуцирует выраженный гуморальный иммунный ответ, что свидетельствует о сохранности соответствующих иммуногенных эпитопов. Показано, что вирусная РНК более стабильна при хранении инактивированного вируса по сравнению с неинактивированным. В исследовании подтвержден факт полной инактивации вируса через 24 ч хранения при температуре 37°C. Отмечено значительное снижение иммуногенной активности вируса при термоинактивации, что подтверждает необходимость тщательного подбора условий хранения для термолабильных хантавирусов. Установлена прямая корреляция между титром вируса и количеством копий вирусной РНК/мл. Добавление человеческого сывороточного альбумина стабилизирует инфекционность вируса при хранении: титр вируса Пуумала оставался на неизменном уровне в течение 3 месяцев хранения при 6±2°C, тогда как в материале без добавления альбумина титр снижался до неопределяемых значений. Добавление 0,1% человеческого сывороточного альбумина к инактивированному вирусному препарату способствует стабилизации его иммуногенных свойств при длительном хранении. Показано, что препараты с добавлением человеческого сывороточного альбумина (0,1–1%) дозозависимо более стабильны при многократном замораживании по показателям содержания вирусной РНК и иммуноген-

Адрес для переписки:
Ветрова Анна Николаевна
108819, Россия, Москва, пос. Московский, п. Института полиомиелита, двлд. 8, корп. 1, ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита).
Тел.: 8 915 273-60-28.
E-mail: ann.vetr.99@mail.ru

Contacts:
Anna N. Vetrova
108819, Russian Federation, Moscow, Settlement "Moskovskiy", Village of Institute of Poliomyelitis, Premises 8, build. 1, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis).
Phone: +7 915 273-60-28.
E-mail: ann.vetr.99@mail.ru

Для цитирования:
Ветрова А.Н., Курашова С.С., Теодорович Р.Д., Попова Ю.В., Блинова Е.А., Набатников П.А., Ткаченко Е.А., Дзагурова Т.К. Влияние условий хранения на стабильность хантавирусных вакцинных препаратов на основе вируса Пуумала // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 2. С. 376–382. doi: 10.15789/2220-7619-OOS-2116

Citation:
Vetrova A.N., Kurashova S.S., Teodorovich R.D., Popova Yu.V., Blinova E.A., Nabatnikov P.A., Tkachenko E.A., Dzagurova T.K. Optimization of storage conditions for Puumala virus based vaccine // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 2, pp. 376–382. doi: 10.15789/2220-7619-OOS-2116

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-OOS-2116

ности. Можно предполагать, что человеческий сывороточный альбумин способствует лучшей сохранности генетического материала вируса при хранении, а белковые эпитопы, ответственные за протективный иммунный ответ в форме индукции нейтрализующих антител, претерпевают в присутствии альбумина менее выраженные конформационные изменения. Эти данные указывают на целесообразность включения человеческого сывороточного альбумина в состав вакцинного препарата.

Ключевые слова: *геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, хантавирус Пуумала, хантавирусный вакцинный препарат, нейтрализующие антитела, иммунный ответ, человеческий сывороточный альбумин.*

OPTIMIZATION OF STORAGE CONDITIONS FOR PUUMALA VIRUS BASED VACCINE

Vetrova A.N.[a,b], Kurashova S.S.[a], Teodorovich R.D.[a], Popova Yu.V.[a], Blinova E.A.[c], Nabatnikov P.A.[a], Tkachenko E.A.[a], Dzagurova T.K.[a]

[a] *Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

[b] *Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation*

[c] *Central Research Institute of Epidemiology of The Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-being Surveillance, Moscow, Russian Federation*

Abstract. We report the effects of storage conditions and human serum albumin addition to the vaccine composition on the immunogenic properties of an experimental vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome. To obtain an experimental vaccine, the Puumala virus, propagated in Vero cells culture, was concentrated, inactivated with beta-propiolactone, and purified by chromatography on the Capto™Core 700 multimodal sorbent (GE Healthcare). The target component in the vaccine was $2\pm0.2 \times 10^6$ of viral RNA copies/ml. The humoral immune response to the vaccine was determined by measuring the neutralizing antibodies in the blood serum of immunized Syrian hamsters *(Mesocricetus auratus).* It was revealed that the Puumala virus inactivated with beta-propiolactone induces a pronounced humoral immune response, which indicates preservation of relevant immunogenic epitopes. According to our study, viral RNA is more stable during storage of the inactivated vs. intact virus. It was confirmed that full virus inactivation occurred after 24 hours of storage at 37°C. A significant decrease in the virus immunogenicity during the thermal inactivation was noted, which confirms the need for careful selection of storage conditions for thermolabile Hantaviruses. A direct correlation was observed between viral titer and viral RNA copy number/ml. Adding human serum albumin stabilized viral infectivity during storage: Puumala virus titer remained at the same level for 3 months of storage at 6±2°C, whereas without albumin, the titer decreased to undetectable level. The addition of 0.1% human serum albumin to the inactivated virus stabilized its immunogenic properties during long-term storage. It was shown that vaccine preparations with human serum albumin (0.1–1%) show higher dose-dependent stability upon repeated freezing assessed by detecting viral RNA level and their immunogenicity. It can be assumed that human serum albumin provides better preservation of of viral genetic material during storage, as well the protein epitopes responsible for the protective immune response in the form of neutralizing antibodies induction, undergo less pronounced conformational changes in the presence of albumin. These data support the addition of human serum albumin to the vaccine formulation.

Key words: *hemorrhagic fever with renal syndrome, Puumala virus, hantavirus vaccine, neutralizing antibodies, immune response, human serum albumin.*

Введение

При производстве цельновирионных вакцин для профилактики хантавирусных инфекций решающее значение имеет разработка и внедрение безопасных и технологичных способов инактивации и хранения хантавирусного вакцинного препарата. Для цельновирионных вакцин помимо выбора оптимального способа инактивирования большое значение имеет конечная формуляция вакцинного препарата, определяющая его стабильность на протяжении срока годности. Человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), который широко используется в качестве криопротектора, также применяется и в качестве стабилизирующей добавки в вакцины. В исследованиях с инкапсулированным антигеном гепатита В были установлены защитные эффекты 0,5–1% ЧСА на стабильность HBsAg в периоде инкапсуляции, высвобождения и восстановления антигенности во время лиофилизации и эмульгирования. Кроме того, при иммунизации крыс Sprague-Dawley препаратом HBsAg-ЧСА наблюдалось повышение уровня анти-HBsAg IgG и Tx1 цитокинов в сравнении с препаратом без ЧСА [11]. В исследованиях Choo J. показано повышение иммуногенной активности аттенуированной вакцины против вируса Денге (bDENV2 HD-MAPs) при добавлении 1% ЧСА в сравнении с аналогичным препаратом без ЧСА, а также стабилизация антигенных структур вириона в процессе хранения в течение 6 месяцев при 4°C в высушенном виде [5]. ЧСА входит в состав вакцины от клещевого энцефалита FSME-Immun®, причем было показано, что его исключение из формуляции

вакцины приводило к увеличению уровней провоспалительных цитокинов TNFα и IL-1β, что влияло на частоту побочных эффектов в виде лихорадки у вакцинированных [8]. В связи с отсутствием для возбудителя ГЛПС лабораторной модели инфекции, представляет интерес поиск чувствительной лабораторной модели для изучения иммуногенной активности вакцинного препарата. Ранее с этой целью мы использовали мышей BALB/c и морских свинок [3]. В данном эксперименте в качестве животной модели для иммунизации были использованы сирийские хомяки. Ответ иммунной системы хомяков на инфекции во многом близок к человеческому [9], более того, они являются основной лабораторной моделью для исследований хантавирусов, вызывающих хантавирусный пульмональный синдром [10]. Целью исследования было определение стабильности и иммуногенности препаратов вируса Пуумала при различных условиях хранения.

Материалы и методы

Вакцинный штамм PUU-TKD-VERO вируса Пуумала, размноженный в культуре клеток Vero, был сконцентрирован методом ультрафильтрации в тангенциальном потоке, как было описано ранее [4]. Хроматографически очищенный на мультимодальном сорбенте Capto™Core 700 (GE Healthcare, США) препарат вируса Пуумала с титром 6,0±0,5 lg ФОЕ/мл (7±0,33 × 10^6 копий РНК/мл) разводили физиологическим раствором до 4,5±0,5 lg ФОЕ/мл (2±0,2 × 10^6 копий РНК/мл). Контрольный образец полученного препарата в аликвотах по 1 мл хранили при температуре –70±2°С. Половину полученного препарата инактивировали бетапропиолактоном в разведении 1:6000 (И-ПУУ). Варианты условий хранения препаратов вируса Пуумала — 3 месяца при температуре 6±2°С; 6 суток при 37±2°С; многократное замораживание материала — 5 и 40 раз при температуре –70±2°С, в том числе с добавлением ЧСА в качестве стабилизатора, представлены в табл.

Контроль на остаточную инфекционность И-ПУУ оценивали в трех последовательных пассажах методами флюоресцирующих антител (МФА) [1], титрованием фокусобразующих единиц (ФОЕ) [6] и определением вирусной РНК в полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) [7]. Иммуногенную активность И-ПУУ оценивали на самках сирийских хомяков в возрасте 2 недель и весом 48±0,3 г. Согласно утвержденному на Этическом комитете заключению, данное исследование соответствует положениям Хельсинской декларации и не нарушает биоэти-

Таблица. Условия хранения

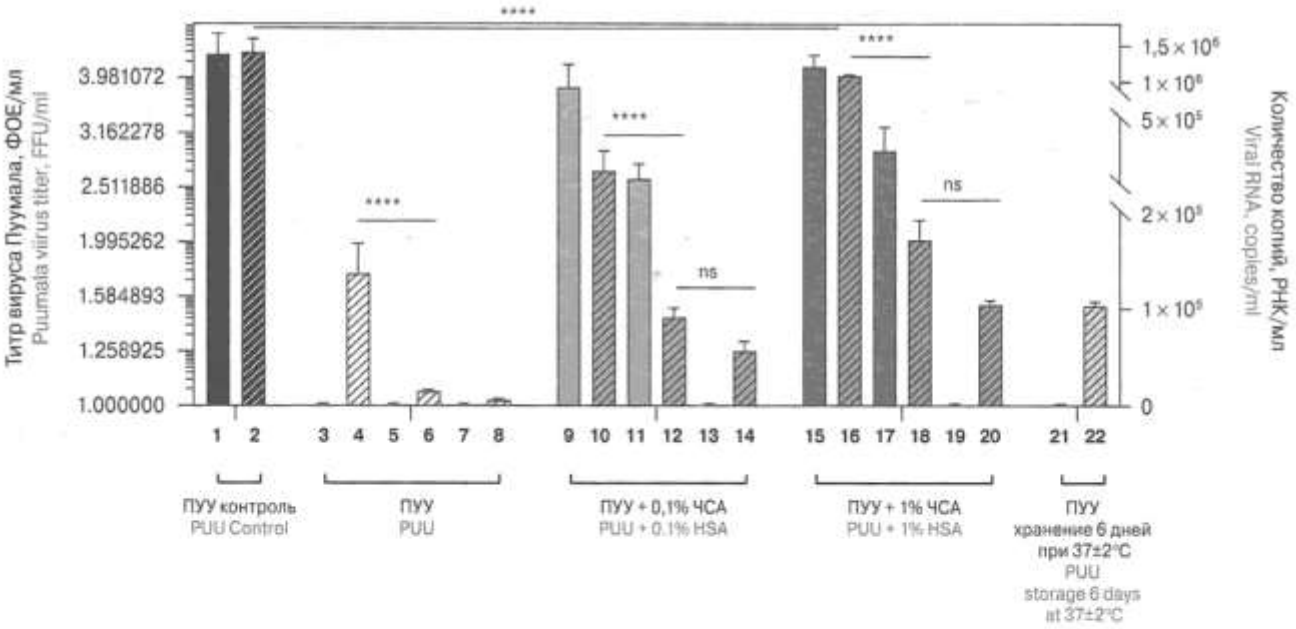
Table. Storage conditions

Условия хранения Storage conditions	**Вирус Пуумала (ПУУ)** Puumala virus (PUU)	**Инактивированный вирус Пуумала (И-ПУУ)** Inactivated Puumala virus (I-PUU)
3 месяца при 6±2°С 3 months at 6±2°С	**ПУУ** PUU	**И-ПУУ** I-PUU
6 суток при 37±2°С 6 days at 37±2°С	**ПУУ-37** PUU-37	**И-ПУУ-37** I-PUU-37
Замораживание 5 раз при –70±2°С Freezing 5 times at –70±2°С	**ПУУ-5з** PUU-5f	**И-ПУУ-5з** I-PUU-5f
Замораживание 40 раз при –70±2°С Freezing 40 times at –70±2°С	**ПУУ-40з** PUU-40f	**И-ПУУ-40з** I-PUU-40f
3 месяца при 6±2°С + 0,1% ЧСА 3 months at 6±2°С + 0,1% HSA	**ПУУ × 0,1** PUU × 0,1	**И-ПУУ × 0,1** I-PUU × 0,1
6 суток при 37±2°С + 0,1% ЧСА 6 days at 37±2°С + 0,1% HSA	**ПУУ-37 × 0,1** PUU-37 × 0,1	**И-ПУУ-37 × 0,1** I-PUU-37 × 0,1
Замораживание 5 раз при –70±2°С + 0,1% ЧСА Freezing 5 times at –70±2°С + 0,1% HSA	**ПУУ-5з × 0,1** PUU-5f × 0,1	**И-ПУУ-5з × 0,1** I-PUU-5f × 0,1
Замораживание 40 раз при –70±2°С + 0,1% ЧСА Freezing 40 times at –70±2°С + 0,1% HSA	**ПУУ-40з × 0,1** PUU-40f × 0,1	**И-ПУУ-40з × 0,1** I-PUU-40f × 0,1
3 месяца при 6±2°С + 1% ЧСА 3 months at 6±2°С + 1% HSA	**ПУУ × 1** PUU × 1	**И-ПУУ × 1** I-PUU × 1
6 суток при 37±2°С + 1% ЧСА 6 days at 37±2°С + 1% HSA	**ПУУ-37 × 1** PUU-37 × 1	**И-ПУУ-37 × 1** I-PUU-37 × 1
Замораживание 5 раз при –70±2°С + 1% ЧСА Freezing 5 times at –70±2°С + 1% HSA	**ПУУ-5з × 1** PUU-5f × 1	**И-ПУУ-5з × 1** I-PUU-5f × 1
Замораживание 40 раз при –70±2°С + 1% ЧСА Freezing 40 times at –70±2°С + 1% HSA	**ПУУ-40з × 1** PUU-40f × 1	**И-ПУУ-40з × 1** I-PUU-40f × 1

ческих правил обращения с животными, участвующими в экспериментах (выписка № 100622-5 от 10.06.2022 г.). Самки хомяков были рандомизированно распределены по 6 особей в каждой группе. Образцы И-ПУУ вводили по 200 мкл в мышечную ткань бедра по схеме: 2 иммунизации с двухнедельным интервалом. Через 14 дней после второй иммунизации все животные были подвергнуты эвтаназии путем декапитации после введения в наркоз сначала стандартной дозой комбинации препаратов Золетил-Ксила [Золетил (10 мг/кг) + Ксила (1 мг/кг)], а затем тройной дозой этих препаратов. Сыворотки крови животных трехкратно исследовали в реакции нейтрализации в клеточной культуре Vero. Результат представлен в виде среднегеометрического значения титра (СГТ) нейтрализующих антител (нАТ) в двоичных логарифмах по 50% редукции числа фокусобразующих единиц (РН/ФОЕ/50). Для количественной оценки РНК в образцах хантавирусного препарата использовали ПЦР в режиме реального времени со штаммоспецифичными праймерами Ufa_F, Ufa_R, и зондом Ufa_Z. Количественное содержание живого вируса ПУУ оценивали по титру вируса методом определения числа фокусобразующих единиц в культуре клеток Vero. Результаты обработаны и проанализированы в программе GraphPad Prism 8.4.3. Представленные усредненные данные являются результатом трех независимых экспериментов, статистически обработанных с использованием одностороннего ANOVA с тестом множественных сравнений Тьюки: ns — не значима, *$p < 0,05$, **$p < 0,01$, ***$p < 0,005$, ****$p < 0,0001$.

Результаты

Титр вируса ПУУ без добавления человеческого сывороточного альбумина снижался через 3 месяца хранения при температуре 6±2°C до неопределяемого уровня по сравнению с контрольным образцом (рис. 1). Хранение ПУУ при 37°C приводило к полной инактивации через 24 ч вне зависимости от добавления 0,1% и 1% человеческого сывороточного альбумина в образцы (данные не показаны). Это подтверждает необходимость тщательного подбора условий хранения, предотвращающих термоинактивацию термолабильных хантавирусов. Добавление 0,1% и 1% человеческого сывороточного альбумина в образцы, хранившиеся при температуре 6±2°C в течение 3 месяцев, стабилизировало титр вируса на уровне



1 Контроль/титр | Control/titer
2 Контроль/РНК | Control/RNA
3 ПУУ/титр | PUU/titer
4 ПУУ/РНК | PUU/RNA
5 ПУУ-5з/титр | PUU-5f/titer
6 ПУУ-5з/РНК | PUU-5f/RNA
7 ПУУ-40з/титр | PUU-40f/titer
8 ПУУ-40з/РНК | PUU-40f/RNA
9 ПУУ×0,1/титр | PUU×0,1/titer
10 ПУУ×0,1/РНК | PUU×0,1/RNA
11 ПУУ-5з×0,1/титр | PUU-5f×0,1/titer
12 ПУУ-5з×0,1/РНК | PUU-5f×0,1/RNA
13 ПУУ-40з×0,1/титр | PUU-40f×0,1/titer
14 ПУУ-40з×0,1/РНК | PUU-40f×0,1/RNA
15 ПУУ×1/титр | PUU×1/titer
16 ПУУ×1/РНК | PUU×1/RNA
17 ПУУ-5з×1/титр | PUU-5f×1/titer
18 ПУУ-5з×1/РНК | PUU-5f×1/RNA
19 ПУУ-40з×1/титр | PUU-40f×1/titer
20 ПУУ-40з×1/РНК | PUU-40f×1/RNA
21 ПУУ-37/титр | PUU-37/titer
22 ПУУ-37/РНК | PUU-37/RNA

Рисунок 1. Зависимость стабильности неинактивированного вируса Пуумала (ПУУ) от условий хранения
Figure 1. A relation between the stability of non-inactivated Puumala virus (PUU) and storage conditions

3,7±0,5 lg ФОЕ/мл. В препарате ПУУ, не содержавшем ЧСА, титр вируса после 5- и 40-кратной заморозки снижался до неопределяемых значений. При добавлении 0,1% и 1% человеческого сывороточного альбумина к образцам, после 5-кратного замораживания титр вируса снижался до 2,6±0,3 и 3,2±0,2 lg ФОЕ/мл соответственно по сравнению с контролем ($p < 0,0001$). После 40-кратной заморозки титр вируса снижался до неопределяемых значений ($p < 0,0001$).

Количество копий вирусной РНК/мл при сравнении с контрольным образцом статистически значимо снизилось ($p < 0,0001$) в образце без ЧСА и с 0,1% ЧСА; для образца с 1% ЧСА снижение не наблюдалось (рис. 1). Замораживание образцов приводило к значимому снижению числа копий РНК/мл до $5,41 \pm 0,3 \times 10^3$ ($p < 0,0001$) при сравнении с образцами, хранившимися при 6±2°С в течение 3 месяцев, вне зависимости от добавления человеческого сывороточного альбумина. Стоит отметить, что наибольшее количество детектируемой РНК как после 5-кратной, так и после 40-кратной заморозки, выявляли при добавлении 1% ЧСА. Хранение образца при 37°С также достоверно снижало количество определяемой РНК/мл. Для препарата ПУУ была установлена прямая зависимость степени сохранности вирусной РНК от количества добавленного человеческого сывороточного альбумина. Установлена прямая корреляция между титром вируса и количеством копий РНК/мл. Эта зависимость сохранялась и при снижении титра вируса в результате хранения. Добавление даже 0,1% человеческого сывороточного альбумина приводило к менее значительному снижению титра вируса и количества копий РНК, но корреляция сохранялась. Увеличение концентрации ЧСА приводило к статистически значимой сохранности титра вируса и количества копий РНК/мл.

Инактивированный вирус обладал большей стабильностью при хранении, в сравнении с ПУУ (рис. 2). Было показано, что вирусная РНК, несмотря на значительное повреждение при инактивации [2], стабильно определялась в течение 24–32 месяцев хранения при температуре 6±2°С, в отличие от ПУУ, что свидетельствует о наличии некоторой РНК-стабилизирующей активности самого бета-пропиолактона. Добавление человеческого сывороточного альбумина дополнительно стабилизировало И-ПУУ при хранении. При этом эффект коррелировал с концентрацией ЧСА. В образцах, подвергнутых 5- и 40-кратному замораживанию, и хранившихся 6 суток при 37°С, было отмечено достоверное снижение количества копий РНК ($p < 0,0001$), обратно пропорциональное концентрации человеческого сывороточного альбумина.

Данные, полученные в этом эксперименте, имеют нормальное распределение (данные не показаны).

Для оценки влияния человеческого сывороточного альбумина на иммуногенную активность И-ПУУ была выбрана концентрация 0,1%. На модели сирийских хомяков (рис. 3) были показаны значительные различия в иммуногенной актив-

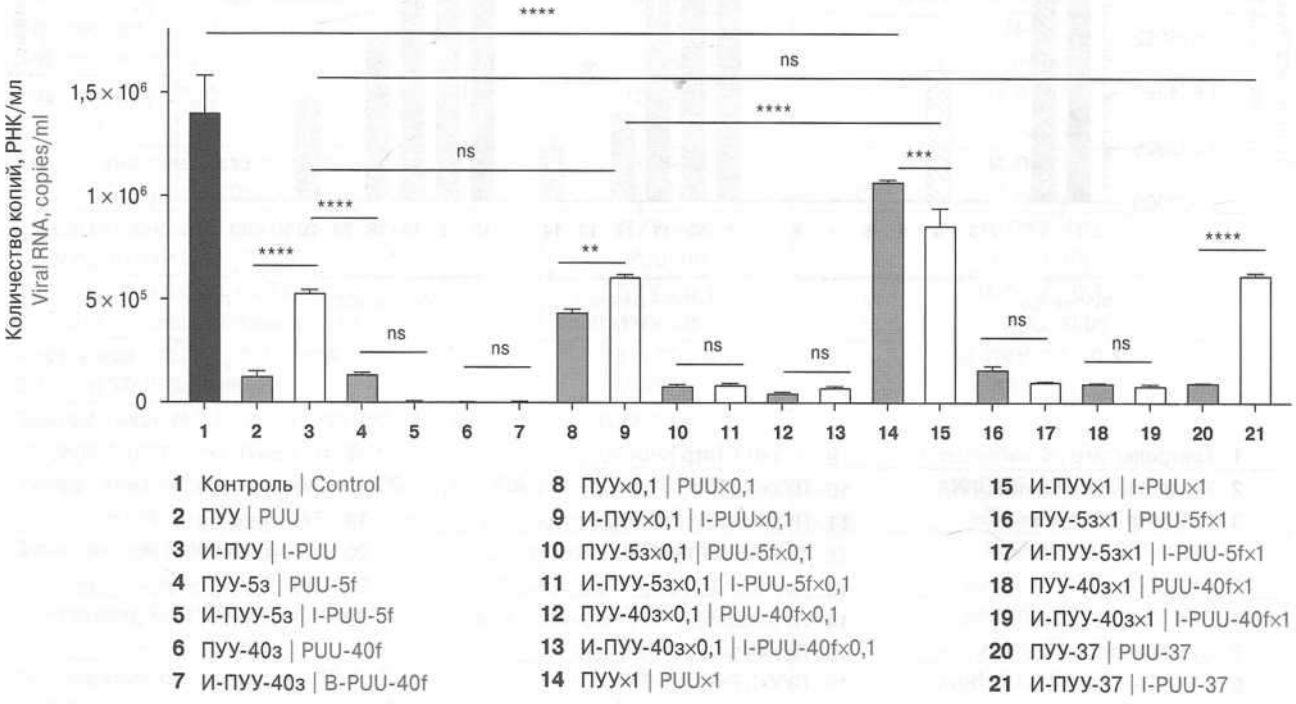


Рисунок 2. Анализ стабильности инактивированного бета-пропиолактоном вируса Пуумала (И-ПУУ)
Figure 2. A stability analysis for Puumala virus inactivated by beta-propiolactone (I-PUU)

ности пяти вариантов хранения И-ПУУ: 3 месяца при 6±2°С без добавок (И-ПУУ); 3 месяца при 6±2°С с добавлением 0,1% ЧСА (И-ПУУ-0,1) или после 5-кратной заморозки (И-ПУУ-5з × 0,1), или после 40-кратной заморозки (И-ПУУ-40з × 0,1); 6 суток при 37°С (И-ПУУ-37). Более высокий титр нАТ отмечен при добавлении 0,1% человеческого сывороточного альбумина ($p = 0,0152$). При этом статистически значимых различий в титре нАТ между группами И-ПУУ и И-ПУУ-5з × 0,1 выявлено не было. И-ПУУ, хранившийся 6 дней при 37°С, обладал меньшей иммуногенной активностью (СГТ = 3±0,5 $\log_2$) в сравнении с И-ПУУ ($p < 0,0001$), что свидетельствует о значительном термическом разрушении иммуногенных эпитопов, сопровождающемся и значительным повреждением вирусной РНК. Также достоверно более низкий уровень нАТ определялся в группе после иммунизации И-ПУУ-40з × 0,1 в сравнении с И-ПУУ ($p < 0,0001$). Таким образом, наблюдалась прямая зависимость между повреждением вирусной РНК в результате термического воздействия при хранении и уровнем иммуногенной активности для И-ПУУ-37 и И-ПУУ-40з × 0,1.

Исследования подтвердили факт потери вирулентной и иммуногенной активности вируса Пуумала при термоинактивации, а также установили влияние условий хранения на детектируемые уровни вирусной РНК. Установлена прямая корреляция между титром вируса и количеством копий РНК/мл. Эта зависимость сохранялась и при снижении титра вируса в результате хранения. Добавление даже 0,1% ЧСА приводило к менее значительному снижению титра вируса и количества копий РНК. Добавление ЧСА к инактивированному вирусу приводило к стабилизации иммунного ответа, а также способствовало стабилизации вирусной РНК на разных этапах хранения И-ПУУ, включая многократное замораживание. Можно предполагать, что белковые эпитопы, ответственные за протективный иммунный ответ, претерпевают менее выраженные конформационные изменения в присутствии ЧСА.

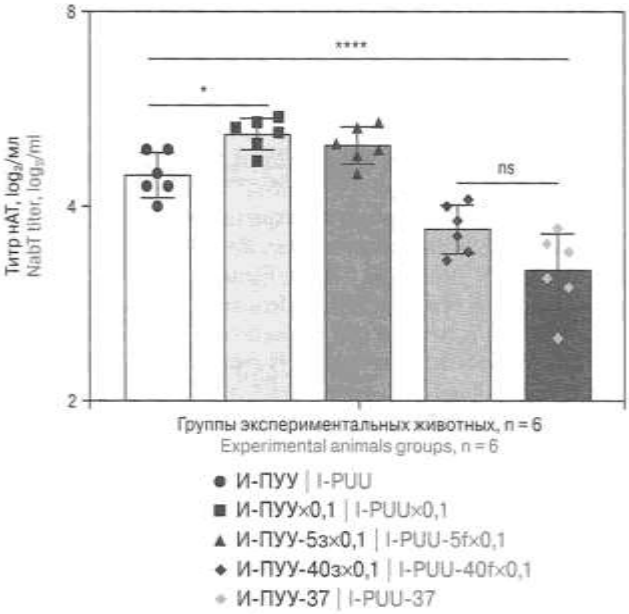


Рисунок 3. Зависимость иммуногенной активности инактивированного бета-пропиолактоном хантавирусного вакцинного препарата от условий хранения

Figure 3. A relation between the immunogenicity of beta-propiolactone inactivated hantavirus vaccine and storage conditions

Примечание. Титры нейтрализующих антител определяли в сыворотках крови сирийских хомяков (n = 6) после двукратной иммунизации в неразведенном виде: хранение 3 месяца при 6±2°С без добавок (И-ПУУ); хранение 3 месяца при 6±2°С с добавлением 0,1% ЧСА (И-ПУУ × 0,1) или после 5кратной заморозки (И-ПУУ-5з × 0,1), или после 40-кратной заморозки (И-ПУУ40з × 0,1); хранение 6 суток при 37°С (И-ПУУ-37). Титры нАТ измеряли методом РН/ФОЕ/50.

Note. The neutralizing antibody titer (n = 6) were determined in Syrian hamsters blood sera after dual immunization in undiluted form: storage for 3 months at 6±2°C without additives (I- PUU); storage for 3 months at 6±2°C with 0.1% HSA (I-PUU × 0.1) or after freezing 5 times (I-PUU-5f × 0.1), or after freezing 40 times (I-PUU-40f × 0.1); storage for 6 days at 37°C (I-PUU-37). The neutralizing antibodies titer (NAb) was determined by the focus reduction neutralization test (FRNT50) using Vero cells.

Список литературы/References

1. Дзагурова Т.К., Ткаченко Е.А., Петров В.А. Эффективность применения культуральных антигенов для серодиагностики ГЛПС с помощью метода иммунофлюоресценции // Вопросы вирусологии. 1988. № 1. С. 71–75. [Dzagurova T.K., Tkachenko E.A., Petrov V.A. The effectiveness of culture antigens for HFRS serodiagnostics by means of the immunofluorescence method. *Voprosy virusologii = Problems of Virology, 1988, no. 1, pp. 71–75. (In Russ.)*]
2. Егорова М.С., Курашова С.С., Дзагурова Т.К., Баловнева М.В., Ишмухаметов А.А., Ткаченко Е.А. Влияние инактивирующих вирус агентов на иммуногенность вакцин против геморрагической лихорадки с почечным синдромом // Биотехнология. 2020. Т. 36, № 2. С. 64–73. [Egorova M.S., Kurashova S.S., Dzagurova T.K., Balovneva M.V., Ishmukhametov A.A., Tkachenko E.A. The effect of virus inactivating agents on the immunogenicity of vaccines against hemorrhagic fever with renal syndrome. *Biotekhnologiya = Biotechnology, 2020, vol. 36, no. 2, pp. 64–73. (In Russ.)*] *doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-2-64-73*
3. Курашова С.С., Баловнева М.В., Ишмухаметов А.А., Теодорович Р.Д., Попова Ю.В., Ткаченко Е.А., Дзагурова Т.К. Гуморальный иммунный ответ после иммунизации морских свинок вакцинным препаратом на основе вируса Пуумала // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 5. С. 971–975. [Kurashova S.S., Balovneva M.V., Ishmukhametov A.A.,

Teodorovich R.D., Popova Yu.V., Tkachenko E.A., Dzagurova T.K. Immune response evaluation in the guinea pigs after immunization with the experimental Puumala virus vaccine. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2022, vol. 12, no. 5, pp. 971–975. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-IRE-1956*

4. Ткаченко Е.А., Ишмухаметов А.А., Дзагурова Т.К., Синюгина А.А., Коротина Н.А., Набатников П.А., Соцкова С.Е., Баловнева М.В., Малкин А.Е. Разработка экспериментально-промышленной технологии производства вакцины для профилактики геморрагической лихорадки с почечным синдромом // Ремедиум. 2015. Т. 6. С. 47–53. [Tkachenko E.A., Ishmukhametov A.A., Dzagurova T.K., Sinyugina A.A., Korotina N.A., Nabatnikov P.A., Sotskova S.E., Balovneva M.V., Malkin A.E. Development of experimental and industrial technology for the production of a vaccine for the prevention of hemorrhagic fever with renal syndrome. *Remedium = Remedium, 2015, vol. 6, pp. 47–53. (In Russ.)*]
5. Choo J.J.Y., McMillan C.L.D., Fernando G.J.P., Hall R.A., Young P.R., Hobson-Peters J., Muller D.A. Developing a stabilizing formulation of a live chimeric dengue virus vaccine dry coated on a high-density microarray patch. *Vaccines (Basel), 2021, vol. 9, no. 11: 1301. doi: 10.3390/vaccines9111301*
6. Dzagurova T.K., Klempa B., Tkachenko E.A., Slyusareva G.P., Morozov V.G., Auste B., Kruger D.H. Molecular diagnostics of hemorrhagic fever with renal syndrome during a Dobrava virus infection outbreak in the European part of Russia. *J. Clin. Microbiol., 2009, vol. 47, no. 12, pp. 4029–4036. doi: 10.1128/JCM.01225-09*
7. Egorova M.S., Kurashova S.S., Ishmukhametov A.A., Balovneva M.V., Deviatkin A.A., Safonova M.V., Ozherelkov S.V., Khapchaev Y.K., Balkina A.S., Belyakova A.V., Dzagurova T.K., Tkachenko E.A. [Real-time PCR assay development for the control of vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome]. *Vopr. Virusol., 2021, vol. 66, no. 1, pp. 65–73. (In Russ.). doi: 10.36233/0507-4088-30*
8. Marth E., Kleinhappl B. Albumin is a necessary stabilizer of TBE-vaccine to avoid fever in children after vaccination. *Vaccine, 2001, vol. 20, no. 3–4, pp. 532–537. doi: 10.1016/s0264-410x(01)00329-2*
9. Miao J., Chard L.S., Wang Z., Wang Y. Syrian hamster as an animal model for the study on infectious diseases. *Front. Immunol., 2019, vol. 10: 2329. doi: 10.3389/fimmu.2019.02329*
10. Safronetz D., Ebihara H., Feldmann H., Hooper J.W. The Syrian hamster model of hantavirus pulmonary syndrome. *Antiviral Res., 2012, vol. 95, no. 3, pp. 282–292. doi: 10.1016/j.antiviral.2012.06.002*
11. Xu W., He J., Wu G., Xiong F., Du H., Wang G. Stabilization and immune response of HBsAg encapsulated within poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres using HSA as a stabilizer. *Int. J. Pharm., 2015, vol. 496, no. 2, pp. 332–341. doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.10.004*

Авторы:

Ветрова А.Н., лаборант-исследователь лаборатории геморрагических лихорадок ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия; студент магистратуры направления «Биотехнология» ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Курашова С.С., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории геморрагических лихорадок ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия;

Теодорович Р.Д., научный сотрудник лаборатории геморрагических лихорадок ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия;

Попова Ю.В., научный сотрудник лаборатории геморрагических лихорадок ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия;

Блинова Е.А., младший научный сотрудник научной группы генной инженерии и биотенологии ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Набатников П.А., ведущий технолог ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия;

Ткаченко Е.А., д.м.н., профессор, руководитель научного направления ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия;

Дзагурова Т.К., д.м.н., зав. лабораторией геморрагических лихорадок ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия.

Authors:

Vetrova A.N., Research Laboratory Assistant, Laboratory of Hemorrhagic Fevers, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russian Federation; Magistracy Student of Biotechnology, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation;

Kurashova S.S., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Hemorrhagic Fevers, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russian Federation;

Teodorovich R.D., Researcher, Laboratory of Hemorrhagic Fevers, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russian Federation;

Popova Yu.V., Researcher, Laboratory of Hemorrhagic Fevers, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russian Federation;

Blinova E.A., Junior Researcher, Science Team for Genetic Engineering and Biotechnology, Central Research Institute of Epidemiology, Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow, Russian Federation;

Nabatnikov P.A., Leading Technologist, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russian Federation;

Tkachenko E.A., DSc (Medicine), Professor, Scientific Supervisor, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russian Federation;

Dzagurova T.K., DSc (Medicine), Head of the Laboratory of Hemorrhagic Fevers, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 12.01.2023
Принята к печати 05.04.2023

Received 12.01.2023
Accepted 05.04.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 2, pp. 383–390

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 2, с. 383–390

КОМПЛЕКСНЫЙ ПРЕПАРАТ НА ОСНОВЕ АНТИБИОТИКА, КЛАСТЕРНОГО СЕРЕБРА И БАКТЕРИОФАГА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ВЫЗВАННЫХ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, В ТОМ ЧИСЛЕ MRSA-ШТАММАМИ

В.Г. Пугачев, О.Д. Тотменина

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

Резюме. Проблемы бактериальных инфекций в медицине и ветеринарии требуют тщательного изучения и быстрого решения. Из-за постоянного, а в ряде случаев нерационального применения антибиотиков, эффективность их воздействия на организм заметно падает, кроме того, устойчивость к антибактериальным препаратам неуклонно растет, появляются антибиотикорезистентные штаммы, которые не поддаются общепринятому медикаментозному лечению. Беспрецедентный рост устойчивости патогенных бактерий к антибиотикам требует создания новых лекарственных средств для борьбы с ними. Одним из способов повышения эффективности антибактериальной терапии является применение комбинированных препаратов. Комбинированные лекарственные формы обеспечивают повышение терапевтического эффекта и не должны быть токсичными для организма. Для преодоления резистентности микроорганизмов, снижения нагрузки антибиотиков на организм, нами предложен комплексный препарат на основе антибиотика, кластерного серебра и специфического бактериофага для лечения инфекционных заболеваний, вызванных *S. aureus*, в том числе MRSA-штаммов. Каждый компонент уже хорошо зарекомендовал себя при лечении инфекционных заболеваний, вызываемых патогенными микроорганизмами. Но при использовании этого комплексного препарата появилась возможность снизить количество антибиотика и избавиться от антибиотикорезистентных и фагоустойчивых форм бактерий. В результате исследования показана эффективность применения комплексного препарата на бактериях *S. aureus* MRSA, при снижении количества антибиотика в такой композиции в 2–4 раза по сравнению с использованием только антибиотика. Эффективность препарата, содержащего 10 мкг/мл гентамицина, 7 мкг/мл кластерного серебра и 10^6 БОЕ/мл бактериофага, на бактериях *S. aureus* MRSA в суспензии сравнима с эффективностью гентамицина с концентрацией 40 мкг/мл. Для бактерий *S. aureus* 209 и *S. aureus* ssp., с пониженной резистентностью к антибиотикам, использование двухкомпонентных композиций (антибиотик + кластерное серебро; антибиотик + бактериофаг) также дает возможность снизить концентрацию антибиотика в 2–3 раза. Необходимо отметить, что увеличение количества кластерного серебра в 4–5 раз при постоянном количестве анти-

Адрес для переписки:
Пугачев Владимир Георгиевич
630559, Россия, Новосибирская область, р.п. Кольцово,
ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (383) 336-60-10, 8 (383) 363-47-00, доб. 2808.
E-mail: pugachev@vector.nsc.ru

Contacts:
Vladimir G. Pugachev
630559, Russian Federation, Novosibirsk region, Koltsovo,
State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector".
Phone: +7 (383) 336-60-10, +7 (383) 363-47-00, add. 2808.
E-mail: pugachev@vector.nsc.ru

Для цитирования:
Пугачев В.Г., Тотменина О.Д. Комплексный препарат на основе антибиотика, кластерного серебра и бактериофага для лечения инфекционных заболеваний, вызванных Staphylococcus aureus, в том числе MRSA-штаммами // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 2. С. 383–390. doi: 10.15789/2220-7619-ACP-3667

Citation:
Pugachev V.G., Totmenina O.D. A combination preparation based on antibiotic, cluster silver and bacteriophage for treatment of infectious diseases caused by Staphylococcus aureus and S. aureus MRSA // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 2, pp. 383–390. doi: 10.15789/2220-7619-ACP-3667

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-ACP-3667

биотика усиливает бактерицидные свойства полученных препаратов. Повторное внесение дозы препарата позволяет добиться значительного снижения концентрации патогенных микроорганизмов в исследуемой суспензии. Данный препарат не имеет ограничений в зависимости от состояния и степени резистентности микроорганизма.

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus, бактериофаг, антибиотики, кластерное серебро, антибиотикорезистентность, фаговая терапия.*

A COMBINATION PREPARATION BASED ON ANTIBIOTIC, CLUSTER SILVER AND BACTERIOPHAGE FOR TREATMENT OF INFECTIOUS DISEASES CAUSED BY *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AND *S. AUREUS* MRSA

Pugachev V.G., Totmenina O.D.

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Abstract. The problems of bacterial infections in medicine and veterinary medicine require careful study and rapid solution. Due to continuous and, in some cases, irrational use of antibiotics, the efficiency of their effect on host has been noticeably decreasing; moreover, resistance to antibacterial drugs is steadily growing, antibiotic-resistant strains emerge, which are not amenable to conventional medical treatment. The unprecedented rise of pathogenic bacteria resistance to antibiotics requires generation of new drugs to combat them. One of the ways to increase the effectiveness of antibiotic therapy is to use combination drugs. Combination dosage forms provide an increased therapeutic effect and should not be toxic to the body. To overcome the microbial resistance reducing host burden of antibiotics, we proposed a combination preparation based on antibiotic, cluster silver and specific bacteriophage for treatment of infectious diseases caused by *S. aureus*, including MRSA strains. Each component has already proven in the treatment of pathogen-caused infectious diseases. But while using this combination agent, it became possible to reduce the amount of antibiotic and get rid of antibiotic-resistant and phage-resistant forms of bacteria. The study showed the effectiveness of the combination preparation on *S. aureus* MRSA bacteria, while reducing the amount of antibiotics in proposed composition by 2–4 times compared to use of antibiotic alone. The efficacy of the preparation containing was as follows: 10 μg/ml gentamicin, 7 μg/ml cluster silver and 10^6 BOV/ml bacteriophage, on *S. aureus* MRSA bacteria in suspension is comparable to the effectiveness of gentamicin with a concentration of 40 μg/ml. For *S. aureus* 209 and *S. aureus* ssp. bacteria with reduced resistance to antibiotics, the use of two-component compositions (antibiotic + cluster silver; antibiotic + bacteriophage) also allowed to reduce the antibiotic concentration by 2–3 times. It should be noted that with a constant amount of antibiotic, increasing the amount of cluster silver by 4–5 times, there is a rise in bactericidal properties of the resulting preparations. Repeated introduction of drug dose allows to achieve a marked decrease in level of pathogenic microorganisms in the suspension studied. This drug has no limitations depending on the state and degree of microbial resistance.

Key words: *Staphylococcus aureus, bacteriophage, antibiotics, cluster silver, antibiotic resistance, phage therapy.*

Введение

Существует целый ряд заболеваний, вызываемых бактериями *Staphylococcus aureus*. Наиболее распространенными заболеваниями, причиной которых может стать золотистый стафилококк, являются заболевания желудочно-кишечного тракта, верхних дыхательных путей, кожные болезни, раневые инфекции, а также пневмонии при внутрибольничных инфекциях. Среди факторов патогенности стафилококков выделяют как структурные компоненты клеток — капсула, белки клеточной стенки, так и секретируемые молекулы — экзотоксины, экзоферменты.

Существенным является возможное взаимодействие между *Staphylococcus aureus* и респираторными вирусами в дыхательных путях.

Долгое время препаратами для лечения инфекций, вызванных *S. aureus*, оставались бета-лактамные антибиотики. Однако в последнее время все чаще выявляется золотистый стафилококк, устойчивый к этой группе препаратов (в том числе MRSA (methicillin-resistant *S. aureus*) — бактерии, устойчивые к метициллину) [3]. Устойчивость микроорганизмов к бета-лактамным препаратам в одних случаях объясняется продукцией бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС), а в других — с наличием специфического белка ПСБ2а (пенициллинсвязывающего белка). Кроме того, низкую эффективность терапии хронических бактериальных инфекций можно объяснить образованием ими биопленок, которые препятствуют проникновению антибиотиков. К настоящему времени достоверно доказана роль микробных биопленок в возникновении и развитии ряда широко распространенных заболеваний. К ним относятся инфекции, связанные с катетеризацией

сосудов, вызванные *S. aureus* и другими грамположительными микроорганизмами; инфекции сердечных клапанов и суставных протезов, вызываемые стафилококками; пародонтит, обусловленный рядом микроорганизмов полости рта; инфекции мочевых путей, обусловленные *Escherichia coli*, и другими патогенами; инфекции среднего уха, причиной которых может быть, например, *Haemophilus influenzae*; инфекционные осложнения муковисцидоза, вызываемые *Pseudomonas aeruginosa* и др. Все эти заболевания с трудом поддаются терапии, имеют высокую частоту рецидивов, некоторые из них могут явиться причиной летальных исходов [6]. Поэтому стоит задача разработки новых препаратов для медицины и ветеринарии. Изучаются возможности использования комбинированных препаратов. Цель комбинированной антибиотикотерапии — достижение синергидного и аддитивного эффектов и расширение спектра антибиотической активности.

Препараты антибактериального действия на основе бактериофагов (БФ) — перспективное направление лечения широкого спектра бактериальных инфекции у животных и человека. Достоинство таких препаратов заключается в высокой специфичности фагов, чувствительности к ним патогенной микрофлоры, эффективность в терапии хронических инфекций, особенно ассоциированных с образованием бактериальных биопленок, сочетаемости со всеми видами традиционной антибактериальной терапии, отсутствии противопоказаний к фагопрофилактике и фаготерапии, отсутствии аллергических реакций, низкой токсичности, отсутствии влияния на нормальную бактериальную флору кишечника и препараты пробиотиков, что дает возможность для их совместного применения [2]. Бактериофаги стимулируют активизацию факторов специфического и неспецифического иммунитета, что усиливает их эффективность в терапии хронических инфекций [4, 8].

Антибактериальная активность ионов серебра обусловлена его взаимодействием с мембраносвязанными и ДНК-связанными белками, что приводит к нарушению функционирования бактерии. Также ионы серебра способствуют образованию активных форм кислорода, что приводит к процессу окисления [5]. Установлено усиление бактерицидного эффекта в результате комплексного воздействия на *S. aureus* раствора коллоидного серебра и неомицина [1]. Использование наночастиц серебра в комплексе с бактериофагом и антибиотиком дает возможность снизить концентрацию последнего без потери антибактериальной активности [4].

В связи с высоким распространением MRSA-штаммов, когда лечение рекомендованными антибиотиками оказывается неэффективным, альтернативным средством может быть комплексный препарат, где действие антибиотика усиливается такими компонентами как бактериофаги, ионы металлов, муколитики или бактериоцины.

Наша стратегия создания новых антибактериальных препаратов заключалась в использовании комбинации вирулентного БФ, препарата, усиливающего его эффективность, — кластерного серебра (КлС) и антибиотика широкого спектра действия, применение которых не вызывает появления устойчивых форм бактерий *S. aureus* на суспензионной культуре и биопленках [9, 10].

Материалы и методы

Объектами исследования были три штамма бактерий *S. aureus* из коллекции ГНЦВБ «Вектор»: *S. aureus* 209; *S. aureus* spp.; *S. aureus* MRSA; штамм бактериофага С-47, специфичный к *S. aureus*.

В работе были использованы антибиотики — гентамицин (ГМН) производства «Биолот» и цефтазидим (ЦАЗ) производства АО «Рафарма», набор дисков индикаторных с антибиотиком ООО «НИЦФ», препарат КлС отечественного производства ООО НПЦ «Вектор-Вита». Питательные среды — Invitrogen™ LB Broth base, Difco™ LB Agar.

Чувствительность бактерий к антибиотическим препаратам определяли диско-диффузионным методом, а минимальную подавляющую концентрацию (МПК) препаратов в суспензионной культуре — методом серийных разведений в бульоне [7].

Суспензию бактерий для экспериментов готовили разведением «ночной» культуры, выращенной в LB-бульоне, до необходимых концентраций. Суспензию бактерий и опытные образцы культивировали на качалке при 37°С, 160 об/мин. Отбор проб осуществляли через 3 и 24 ч. Для определения концентрации бактерий делали десятикратные разведения образцов и высевали на чашки Петри с LB-агаром, которые инкубировали в термостате на 37°С, 24 ч. Для определения концентрации БФ использовали метод агаровых слоев по Грациа.

Все эксперименты проводили в трех повторностях. Статистическую обработку проводили на компьютере с использованием критерия Стьюдента.

Рабочие концентрации подготовленных препаратов:

– А — 7,5 мкг/мл ГМН + 7 мкг/мл КлС + 10^6 БОЕ/мл БФ;
– В — 10 мкг/мл ГМН + 1,7 мкг/мл КлС + 10^6 БОЕ/мл БФ;

– C — 10 мкг/мл ГМН + 7 мкг/мл КлС + 10^6 БОЕ/мл БФ;
– D — 10 мкг/мл ГМН + 10 мкг/мл КлС + 10^6 БОЕ/мл БФ;
– E — 20 мкг/мл ГМН + 3,5 мкг/мл КлС + 10^6 БОЕ/мл БФ;
– F — 10 мкг/мл ГМН + 3,5 мкг/мл КлС + 10^6 БОЕ/мл БФ;
– G — 5 мкг/мл ГМН + 3,5 мкг/мл КлС + 10^6 БОЕ/мл БФ;
– H — 5 мкг/мл ГМН + 1,7 мкг/мл КлС + 5×10^5 БОЕ/мл БФ;
– M — 2 мкг/мл ГМН + 0,8 мкг/мл КлС + 2×10^5 БОЕ/мл БФ;
– K — 20 мкг/мл ЦАЗ + 3,5 мкг/мл КлС + 10^6 БОЕ/мл БФ.

Результаты

Частое и бесконтрольное использование антибиотиков приводит к возникновению множественной устойчивости бактерий к препаратам, снижению эффективности антибактериальной терапии, необходимости применения комбинации известных лекарственных средств, обладающих синергидным действием.

Предложен для использования трехкомпонентный препарат, обладающий бактерицидным действием в отношении патогенных микроорганизмов *S. aureus*, показана возможность соединения компонентов, имеющих принципиально разные механизмы антимикробного действия, для снижения дозы антибиотика при сочетанном использовании их с КлС и БФ.

Исследовали влияние препарата и отдельных его компонентов на динамику роста патогенных бактерий.

В экспериментах показано, что внесение БФ С-47 к суспензионным культурам *S. aureus* 209; *S. aureus* spp., *S. aureus* MRSA приводит к развитию фаговых частиц, урожай фага достигает 10^8–10^9 БОЕ/мл, при этом остаются устойчивые бактерии, способные к инфекции, в количестве 10^5–10^6 КОЕ/мл.

Показано, что внесение КлС в количестве от 3,5 до 10 мкг/мл к суспензионным культурам *S. aureus* 209; *S. aureus* spp., *S. aureus* MRSA с концентрацией 10^4–10^6 КОЕ/мл бактериостатического и бактерицидного эффекта не оказывает. Динамика роста подобна контрольным образцам.

Исследование антибиотической устойчивости бактерий *S. aureus* диско-диффузионным методом показало, что штаммы *S. aureus* 209 и *S. aureus* spp. чувствительны ко всем использованным антибиотикам — оксациллин 1 мкг, ванкомицин 30 мкг, цефтазидим (ЦАЗ) 30 мкг, эритромицин 15 мкг, бензилпенициллин 10 ЕД, гентамицин (ГМН) 10 мкг, ципро-

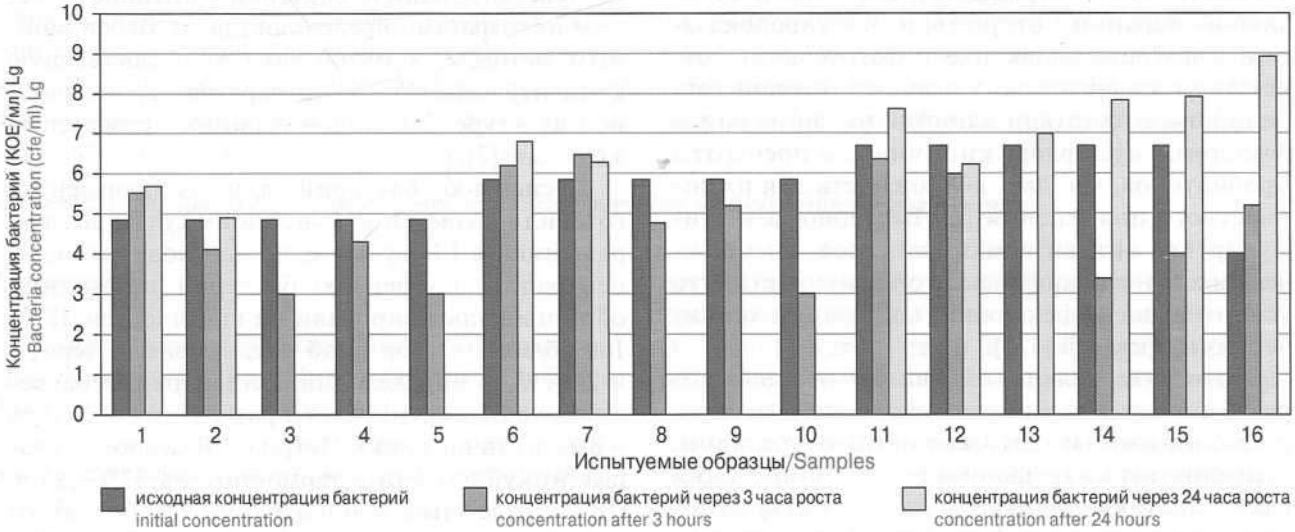


Рисунок 1. Динамика роста *Staphylococcus aureus* MRSA в присутствии препаратов

Figure 1. *Staphylococcus aureus* MRSA growth dynamics exposed to the investigational preparation

Примечание. Образцы: 16 — контроль, исходная концентрация бактерий 10^4 КОЕ/мл; 1–5 с исходной концентрацией бактерий 7×10^4 КОЕ /мл; образцы 6–10 с исходной концентрацией 7×10^5 КОЕ /мл; образцы 11–15 с исходной концентрацией 5×10^6 КОЕ /мл. К образцам 1, 6, 11 добавлен препарат А; к образцам 2, 7, 12 — препарат В; к образцам 3, 8, 13 — препарат С; к образцам 4, 9, 14 — препарат D; к образцам 5, 10, 15 — препарат Е.

Note. Samples: 16 — control, initial concentration 10^4 CFE/ml; 1–5 initial concentration 7×10^4 CFE/ml; 6–10 initial concentration 7×10^5 CFE/ml; 11–15 initial concentration 5×10^6 CFE/ml. Preparation A was added to samples 1, 6, 11; preparation B was added to samples 2, 7, 12; preparation C was added to samples 3, 8, 13; preparation D was added to samples 4, 9, 14; preparation E was added to samples 5, 10, 15.

флоксацин 5 мкг, клиндамицин 2 мкг, левофлоксацин 5 мкг, тогда как *S. aureus* MRSA проявляет чувствительность лишь к ванкомицину и ГМН.

Для суспензионной культуры *S. aureus* MRSA с концентрацией 10^4–10^6 КОЕ/мл количество ГМН от 10 до 30 мкг/мл не является бактерицидным, а для бактерии *S. aureus* 209; *S. aureus* spp. в количестве до 10^6 КОЕ/мл концентрации ГМН от 5 до 7,5 мкг/мл являются бактерицидными, выше 10^6 КОЕ/мл — бактериостатическими.

На основании полученных данных предложен комплексный препарат на основе антибиотика, КлС и БФ С-47 для лечения инфекционных заболеваний, вызванных *S. aureus*, в том числе MRSA-штаммов.

Подготовили разные варианты препаратов и апробировали их на штаммах бактерий *S. aureus*.

Исследование показало, что при обработке суспензии бактерий *S. aureus* MRSA с концентрациями от 10^3 до 5×10^4 КОЕ/мл, препаратами A, B, C, D, E уже через 3 ч наблюдается бактерицидный эффект. Через 24 ч жизнеспособные бактерии в суспензии отсутствуют.

Препараты A, B оказывают бактериостатический эффект на суспензионную культуру с концентрацией бактерий от 7×10^4 до 5×10^6 КОЕ/мл (рис. 1). Увеличение количества как антибиотика, так и КлС оказывает бактерицидный эффект на бактерии с концентрацией от 7×10^4 до 5×10^5 КОЕ/мл (рис. 1, образцы 3, 4, 5, 8, 9, 10) в течение 24 ч. Бактериостатический эффект наблюдается и при использовании более высокой концентрации бактерий (рис. 1, образцы 11–15).

Исследования показывают, что увеличение количества КлС от 1,7 до 10 мкг/мл при постоянной концентрации ГМН 10 мкг/мл позволяет снижать концентрацию бактерий *S. aureus* MRSA до нулевых значений (рис. 2).

Показано, что бактерицидный эффект достигается обработкой суспензионной культуры *S. aureus* 209 с концентрацией 10^4–10^5 КОЕ/мл препаратами F, G, H, а бактериостатический — препаратом M. Для бактерий в более высокой концентрации — 10^6 КОЕ/мл — бактерицидным действием обладает лишь препарат F (рис. 3).

Для *S. aureus* ssp. получены аналогичные результаты: бактерицидный эффект установлен при обработке суспензионной культуры *S. aureus* ssp. с концентрацией 10^4–10^5 КОЕ/мл препаратами F, G, H, а бактериостатический — препаратом M. Для бактерий в более высокой концентрации — 10^6 КОЕ/мл — бактерицидным действием обладают препараты F, G.

Исследования бактерицидного действия препарата и комбинации отдельных его компонентов показали, что в отношении суспензионной культуры *S. aureus* MRSA с концентрацией 10^4–10^5 КОЕ/мл высокой эффективностью обладает предложенный трехкомпонентный препарат, в отличие от двухкомпонентных композиций, например ГМН + КлС или ГМН + БФ, поскольку только в этом случае наблюдается устойчивый бактерицидный эффект.

Для суспензионных культур *S. aureus* 209 и *S. aureus* ssp. с концентрацией 10^4–10^5 КОЕ/мл показана возможность использования двух-

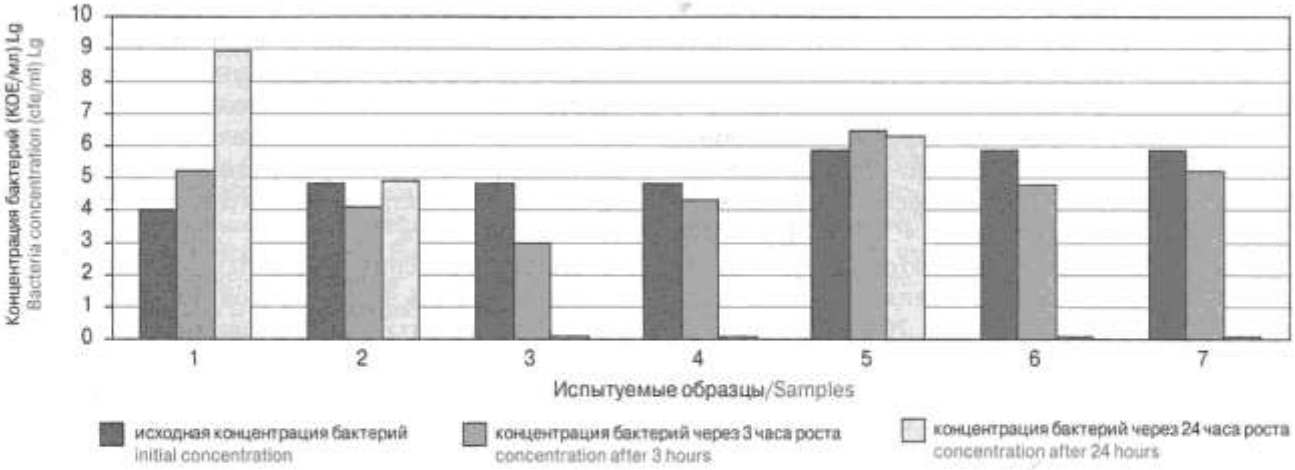


Рисунок 2. Бактерицидное действие препарата на *S. aureus* MRSA в зависимости от количества кластерного серебра

Figure 2. Combination preparation-related bactericidal action against *S. aureus* MRSA based on silver amount

Примечание. Образы: 1 — контроль; 2–4 с исходной концентрацией 7×10^4 КОЕ /мл; 5–7 с исходной концентрацией 7×10^5 КОЕ /мл. К образцам 2, 5 — добавлен препарат B; к образцам 3, 6 — препарат C; к образцам 4, 7 — препарат D.

Note. Samples: 1 — the control; 2–4 initial concentration 7×10^4 CFE/ml; 5–7 initial concentration 7×10^5 CFE/ml. Preparation B was added to samples 2, 5; preparation C was added to samples 3, 6; preparation D was added to samples 4, 7.

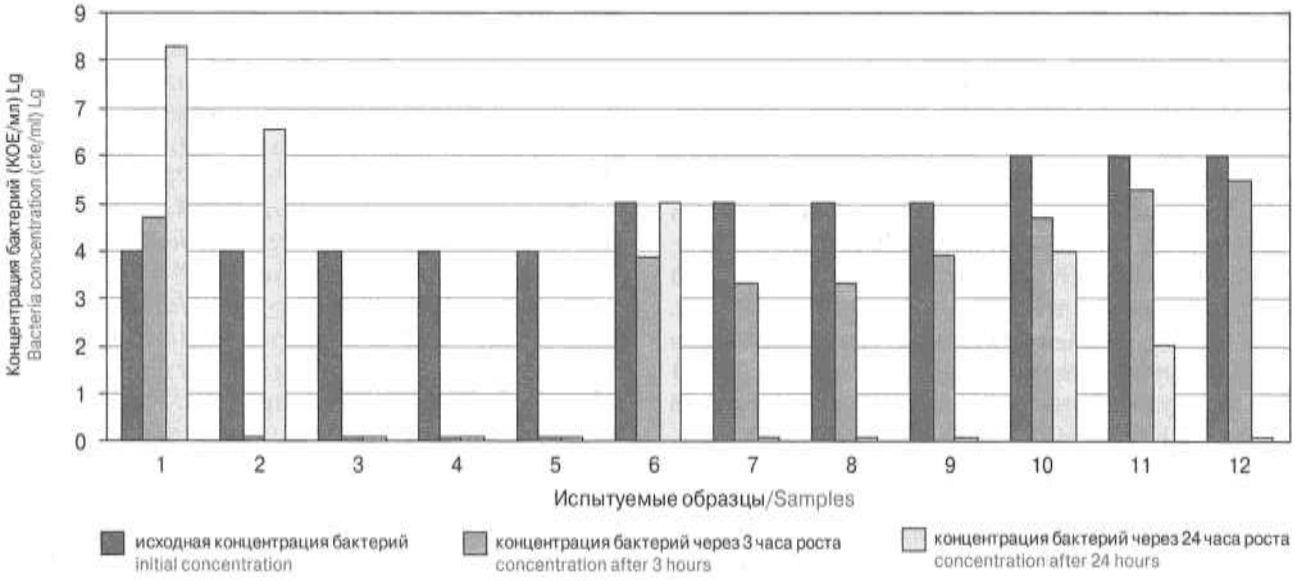


Рисунок 3. Динамика роста *S. aureus* 209 в присутствии препаратов

Figure 3. *S. aureus* 209 growth dynamics exposed to the combination preparation

Примечание. Образец 1 — контроль; образцы 2–5 с исходной концентрацией 10^4 КОЕ/мл; образцы 6–9 с исходной концентрацией 10^5 КОЕ/мл; образцы 10–12 с исходной концентрацией 10^6 КОЕ/мл. К образцам 2, 6 добавлен препарат M; к образцам 3, 7, 10 — препарат H; к образцам 4, 8, 11 — препарат G; к образцам 5, 9, 12 — препарат F.

Note. Samples: 1 — the control; 2–5 initial concentration 10^4 CFE/ml; 6–9 initial concentration 10^5 CFE/ml; 10–12 initial concentration 10^6 CFE/ml. Preparation M was added to samples 2, 6; preparation H was added to samples 3, 7, 10; preparation G was added to samples 4, 8, 11; preparation F was added to samples 5, 9, 12.

компонентных композиций, например антибиотик + КлС, антибиотик + БФ, в связи с пониженной резистентностью данных микроорганизмов. Показано, что использование ЦАЗ в сочетании с КлС или БФ при концентрациях патогенов 10^4–10^5 КОЕ/мл дает результат подобный использованию препарата антибиотик + КлС + БФ. Но при увеличении концентрации бактерий использование трехкомпонентного препарата остается единственно возможным вариантом.

Подобные результаты получены в работе с *S. aureus* 209 и *S. aureus* ssp. при использовании препарата К, содержащего ЦАЗ: 20 мкг/мл ЦАЗ + 3,5 мкг/мл КлС + 10^6 БОЕ/мл БФ. Двухкомпонентные смеси готовили в соответствии с используемыми препаратами: 20 мкг/мл ЦАЗ + 3,5 мкг/мл КлС; 20 мкг/мл ЦАЗ + 10^6 БОЕ/мл БФ. При внесении одного антибиотика показано снижение концентрации бактерий на два порядка через 24 ч инкубирования, что соответствует воздействию трехкомпонентного препарата через 3 ч. Через 24 ч инкубирования в образцах, обработанных препаратами (двух- и трехкомпонентные композиции) живые бактерии отсутствовали.

Необходимо отметить, что препараты, приготовленные на основе разных антибиотиков, обладают стабильным, пролонгированным действием.

В работе показано, что повторное внесение дозы препарата позволяет добиться снижения концентрации патогенных микроорганизмов в исследуемой суспензии. При использовании препаратов А и С на суспензии бактерий *S. aureus* MRSA с исходной концентрацией $2{,}6 \times 10^5$ КОЕ/мл показано, что однократное внесение препарата оказывает бактериостатический эффект — в суспензии остается 10^4–10^5 КОЕ/мл, повторная обработка приводит к снижению концентрации бактерий до нуля. Следовательно, даже для бактерий *S. aureus* MRSA возможно использование препарата с минимальным количеством антибиотика (7–10 мкг/мл), чтобы достичь бактерицидного эффекта.

Анализ экспериментальных данных показал возможность эффективной борьбы с метициллинрезистентными бактериями — *S. aureus* MRSA. Обработка бактерий *S. aureus* MRSA с концентрацией до 10^6 КОЕ/мл препаратами, содержащими 10–20 мкг/мл ГМН, приводит к их гибели, тогда как использование только антибиотика в таком же количестве не влияет на рост бактерий. При увеличении концентрации бактерий данные препараты оказывают бактериостатический эффект. При обработке *S. aureus* 209 и *S. aureus* ssp. препаратом, содержащим 2 мкг/мл ГМН отмечается бактериостатический эффект, а от 5 до 10 мкг/мл — бактерицидный. Для бактерий с более высокой кон-

центрацией — выше 10^6 КОЕ/мл рекомендуется использовать препарат, содержащий: 10 мкг/мл ГМН + 3,5 мкг/мл КлС + 10^6 БОЕ/мл.

Обсуждение

Таким образом, предложенный комплексный препарат позволяет снижать дозу используемого антибиотика в 2–4 раза без потери эффективности и подавлять развитие антибиотикорезистентных и фагоустойчивых форм *S. aureus*.

1. В ходе исследований показана эффективность применения трехкомпонентного препарата — антибиотик + КлС + БФ — для достижения бактерицидного действия на суспензионной культуре *S. aureus* MRSA, причем количество антибиотика в такой композиции можно снизить в 2–3 раза по сравнению с использованием только антибиотика.

2. Для суспензионных культур *S. aureus* 209 и *S. aureus* ssp. показана возможность использования двухкомпонентных композиций — антибиотик + КлС; антибиотик + БФ, в связи с пониженной резистентностью данных микроорганизмов, что также дает возможность снизить концентрацию антибиотика.

3. Необходимо отметить, что при постоянном количестве антибиотика, увеличивая количество кластерного серебра в 4–5 раз, наблюдается усиление бактерицидных свойств полученных препаратов.

4. Данный препарат не имеет ограничений в зависимости от состояния и степени резистентности микроорганизма.

5. Повторное внесение дозы препарата позволяет добиться значительного снижения концентрации патогенных микроорганизмов в исследуемой суспензии.

Данный препарат можно рекомендовать для использования при закрытом промывном дренаже для тяжелых форм гнойно-септических заболеваний, лечения кожных заболеваний и инфекций верхних дыхательных путей.

Работа была выполнена в рамках ГЗ 4/19 «Применение вирусов для решения задач биотехнологии».

Список литературы/References

1. Афонина И.А., Краева Л.А., Ценева Г.Я. Характеристика чувствительности Staphylococcus aureus и Candida albicans к противомикробным препаратам и коллоидному серебру. // Инфекция и иммунитет. 2011, Т. 1, № 2. С. 177–180. [Afonina I.A., Kraeva L.A., Tseneva G.Y. Characteristic of sensitivity of staphylococcus aureus and candida albicans to antibacterial preparations and colloidal silver. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2011, vol. 1, no. 2, pp. 177–180. (In Russ.)*]
2. Асланов Б.И., Зуева Л.П., Кафтырева Л.А., Бойцов А.Г., Акимкин В.Г., Долгий А.А., Брусина Е.Б., Дроздова О.М. Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике. Федеральные клинические рекомендации. М., 2014. 39 с. [Aslanov B.I., Zueva L.P., Kaftyreva L.A., Boytsov A.G., Akimkin V.G., Dolgiy A.A., Brusina E.B., Drozdova O.M. Rational use of bacteriophages in therapeutic and antiepidemic practice. Federal clinical guidelines. *Moscow, 2014. (In Russ.)*]
3. Божкова С.А., Полякова Е.М., Краснова М.В. Преодоление устойчивости к гентамицину у метициллинорезистентных штаммов стафилококка // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2017. № 8, Ч. 1. С. 97–103. [Bozhkova S.A., Polyakova E.M., Krasnova M.V. The breaking of resistance to gentamycin in methicillin resistant Staphylococcus aureus strains. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovanii = International Journal of Applied and Fundamental Research, 2017, no. 8, pt 1, pp. 97–103. (In Russ.)*]
4. Патент № 2672869 Российская Федерация, МПК A61K 35/76 (2015.01); A61K 33/38 (2006.01); A61K 47/06 (2006.01); A61P 31/04 (2006.01). Антибактериальное средство на основе бактериофага: № 2017142076; заявлено 2017.12.01: опубликовано 2018.11.20. / Пугачев В.Г., Тотменина О.Д. Патентообладатель: ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. 14 с. [Patent No. 2672869 Russian Federation, Int. Cl. A61K 35/76 (2015.01); A61K 33/38 (2006.01); A61K 47/06 (2006.01); A61P 31/04 (2006.01). Antibacterial agent based on bacteriophage. No. 2017142076; application: 2017.12.01: date of publication 2018.11.20 / Pugachev V.G., Totmenina O.D. Proprietor: Federalnoe byudzhetnoe uchrezhdenie nauki "Gosudarstvennyj nauchnyj tsentr virusologii i biotekhnologii "Vektor" Federalnoj sluzhby po nadzoru v sfere zashchity prav potrebitelej i blagopoluchiya cheloveka (FBUN GNTS VB "Vektor" Rospotrebnadzora). 14 p.]
5. Шкиль Н.А., Бурмистров В.А., Соколов М.Ю. Антимикробные свойства, фармакотоксикологические характеристики и терапевтическая эффективность препарата арговит при желудочно-кишечных болезнях телят // Научный журнал КубГАУ. 2011. № 68 (04). 11 с. [Shkil N.A., Burmistrov V.A., Sokolov M.Yu. Antimicrobial properties, pharmacotoxicological characteristics and therapeutic efficacy of argovit in gastrointestinal diseases of calves. *Nauchnyi zhurnal KubGAU = KubGAU Scientific Journal, 2011, no. 68 (04), 11 p. (In Russ.)*]
6. Харсеева Г.Г., Фролова Я.Н., Миронов А.Ю. Биопленки патогенных бактерий: биологические свойства и роль в синхронизации инфекционного процесса // Успехи современной биологии. 2015. Т. 135, № 4. С. 346–354. [Kharseeva G.G., Frolova Ya.N., Mironov A.Yu. Biofilms of pathogenic bacteria: biological properties and their role in chronization of inflammatory process. *Uspekhi sovremennoi biologii = The Successes of Modern Biology, 2015, vol. 135, no. 4, pp. 346–354. (In Russ.)*]
7. Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. МУК 4.12.1890-04. М., 2004. 65 с. [Guidelines for determining the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs. MUK 4.12.1890-04. *Moscow, 2004. 65 p. (In Russ.)*]
8. Miroshnikov K.A., Kulikov E.E., Darbeeva O.S., Lysko K.A., Ignat'ev G.M. [Genetic and molecular principles for the selection of Pseudomonas and Staphylococcus therapeutic bacteriophages]. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol., 2014, vol. 50, no. 3, pp. 338–344. (In Russ.)*

9. Morones-Ramirez J.R., Winkler J.A., Spina C.S., Collins J.J. Silver enhances antibiotic activity against gram-negative bacteria. *Sci. Transl. Med., 2013, vol. 5, no. 190: 190ra81. doi: 10.1126/scitranslmed.3006276*
10. Ruden S., Hilpert K., Berditsch M., Wadhwani P., Ulrich A.S. Synergistic interaction between silver nanoparticles and membrane-permeabilizing antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents Chemother., 2009, vol. 53, no. 8, pp. 3538–3540. doi: 10.1128/AAC.01106-08*

Авторы:
Пугачев В.Г., ведущий научный сотрудник отдела биофизики и экологических исследований ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;
Тотменина О.Д., научный сотрудник отдела биофизики и экологических исследований ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия.

Authors:
Pugachev V.G., Senior Researcher, State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;
Totmenina O.D., Researcher, State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation.

Поступила в редакцию 08.02.2023
Принята к печати 09.03.2023

Received 08.02.2023
Accepted 09.03.2023

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2023, vol. 13, no. 2, pp. 391–396

Инфекция и иммунитет
2023, Т. 13, № 2, с. 391–396

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ РАЗВИТИЯ ВИРУСНО-БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИИ, ВЫЗВАННОЙ SARS-CoV-2 И *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, ОСЛОЖНЕННОЙ ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМ РАСПРОСТРАНЕНИЕМ ИНФЕКЦИИ С РАЗВИТИЕМ СЕПТИЦЕМИИ

Л.П. Романова, О.В. Воробьева

ФГОУ ВО Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова, г. Чебоксары, Россия

Резюме. Больной А.И., 58 лет, в течение нескольких часов 06.09.2022 г. находился на стационарном лечении в инфекционном отделении БУ «Новочебоксарская городская больница» Минздрава Чувашии. Поступил в сопровождении бригады скорой медицинской помощи в тяжелом состоянии, со слов сына с ночи 05.09.2022 и до обеда 06.09.2022 были жалобы на температуру гектического характера, боль в брюшной полости разлитого характера. Помимо этого, пациент отмечал кашель, чувство нехватки воздуха. В связи с этим была вызвана бригада скорой медицинской помощи. При поступлении на компьютерной томографии были выявлены признаки двусторонней вирусной интерстициальной пневмонии с площадью поражения 51% и участками консолидации. Диагноз COVID-19 был подтвержден при исследовании назофарингеального мазка методом ПЦР. В анамнезе: дисциркуляторная энцефалопатия 1–2 степени, артериальная гипертензия, хронический индуративный панкреатит. Объективно: при поступлении температура тела составляла 38,8°C, SaO_2 — 56%, артериальное давление — 93/50 мм рт.ст. При глубокой пальпации отмечалась разлитая болезненность и напряжение мышц передней брюшной стенки. Оценка состояния по шкале NEWS2 составляла 11 баллов. Было начато лечение, но внезапно наступил летальный исход. Выставлен клинический диагноз: Новая коронавирусная инфекция COVID-19, вирус идентифицирован. Конкурирующее заболевание: Острый парапанкреатит. Абсцесс брыжейки тонкого кишечника. Осложнения основного заболевания: Двусторонняя вирусная интерстициальная пневмония. Острый респираторный дистресс-синдром. Септицемия (SOFA — 2 балла, прокальцитонин = 2 нг/мл). При секционном исследовании были выявлены признаки вирусно-бактериальной пневмонии. В головном мозге — перицеллюлярный и периваскулярный отек, в сердце — выраженный отек интерстиция, фрагментация мышечных волокон, в почках — некронефроз, в поджелудочной железе — перидуктальный, междольковый и внутридольковый склероз, между островками — нейтрофильные инфильтраты. В лимфоидной и кроветворной ткани отмечалась гиперплазия, определялись васкулиты, признаки межуточного воспаления в паренхиматозных органах. По результатам микробиологического исследования ткани легкого был выявлен обильный рост *Klebsiella pneumoniae*. *Заключение.* Причиной смерти больного А.И.

Адрес для переписки:
Романова Любовь Петровна
428015, Россия, г. Чебоксары, Московский пр., 15,
ФГБОУ ВО Чувашский государственный университет
им. И.Н. Ульянова.
Тел.: 8 927 858-05-18 (моб.).
E-mail: lyubasha_romanova_65@mail.ru

Contacts:
Lyubov P. Romanova
428045, Russian Federation, Cheboksary, Moskovskii pr., 15,
I.N. Ulyanov Chuvash State University.
Phone: +7 927 858-05-18 (mobile).
E-mail: lyubasha_romanova_65@mail.ru

Для цитирования:
Романова Л.П., Воробьева О.В. Клинический случай развития вирусно-бактериальной пневмонии, вызванной SARS-CoV-2 и Klebsiella pneumoniae, осложненной генерализованным распространением инфекции с развитием септицемии // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 2. С. 391–396. doi: 10.15789/2220-7619-ACC-2030

Citation:
Romanova L.P., Vorobeva O.V. A clinical case of viral-bacterial pneumonia caused by SARS-CoV-2 and Klebsiella pneumoniae, complicated by a generalized infection with developed septicemia // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 2, pp. 391–396. doi: 10.15789/2220-7619-ACC-2030

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-ACC-2030

58 лет явилась новая коронавирусная инфекция COVID-19, вызвавшая двустороннюю вирусную пневмонию, с присоединением бактериальной микрофлоры, осложненная острой респираторной недостаточностью. Также имело место генерализованное распространение инфекции с развитием септицемии и полиорганной недостаточности (легочно-сердечной, церебральной, почечной).

Ключевые слова: *COVID-19, пневмония, Klebsiella, сепсис, септицемия, морфология.*

A CLINICAL CASE OF VIRAL-BACTERIAL PNEUMONIA CAUSED BY SARS-CoV-2 AND *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, COMPLICATED BY A GENERALIZED INFECTION WITH DEVELOPED SEPTICEMIA

Romanova L.P., Vorobeva O.V.

Chuvash State University after I.N. Ulyanova, Cheboksary, Russian Federation

Abstract. Patient A.I., 58 years old, on September 6, 2022 was hospitalized within several hours in the infectious diseases department of the Novocheboksarskaya City Hospital of the Ministry of Health of Chuvashia. The patient in serious condition was admitted being accompanied by ambulance team, according to his son, from the night of 09/05/2022 until the afternoon of 09/06/2022 the patient complained of hectic temperature, diffuse pain in the abdominal cavity. In addition, the patient noted cough, feeling of air lack. As a result, an ambulance was called in. At admission, computed tomography revealed signs of bilateral viral interstitial pneumonia, with a lesion area of 51% and areas of consolidation. The diagnosis of COVID-19 was confirmed by PCR in a nasopharyngeal swab. History: Dyscirculatory encephalopathy of degrees 1–2, arterial hypertension, chronic indurative pancreatitis. Objective examination: on admission the body temperature was 38.8°C. SaO_2 — 56%. Blood pressure — 93/50 mm Hg. Art. Deep palpation revealed diffuse soreness and tension in the muscles of the anterior abdominal wall. The assessment of the condition on the NEWS2 scale comprised 11 points. Treatment was started, but a sudden death occurred. A clinical diagnosis was made: a new coronavirus infection COVID-19, virus verified. Competing disease: Acute parapancreatitis. Abscess of the mesentery of the small intestine. Complications of the underlying disease: Bilateral viral interstitial pneumonia. Acute respiratory distress syndrome. Septicemia (SOFA — 2 points, procalcitonin = 2 ng/ml). Post-mortem sectional examination revealed signs of viral-bacterial pneumonia. In the brain — pericellular and perivascular edema, heart — prominent edema of the interstitium, muscle fibers fragmented, kidneys — necronephrosis, pancreas — periductal, interlobular and intralobular sclerosis of the pancreas, between the islets of neutrophilic infiltrates. Hyperplasia was noted in the lymphoid and hematopoietic tissue, vasculitis, signs of interstitial inflammation in the parenchymal organs were determined. According to the results of microbiological examination of lung tissue, abundant growth of *Klebsiella pneumoniae* was found. *Conclusion*. The cause of death of the patient A.I. 58 years old was a novel coronavirus infection COVID-19, which caused bilateral viral pneumonia, in parallel with bacterial microflora, complicated by acute respiratory failure. There was also a generalized spread of infection with developed septicemia and multiple organ failure (pulmonary, cerebral, renal).

Key words: *COVID-19, pneumonia, Klebsiella, sepsis, septicemia, morphology.*

Введение

Новая коронавирусная инфекция (COVID-19) представляет собой самую актуальную проблему для всего мира на протяжении последних лет. Как показали результаты китайских специалистов, помимо нарушений работы дыхательной системы, у части больных может развиться сепсис и септический шок. Летальность при сепсисе вызвана дисфункцией и полиорганной недостаточностью. На клеточном уровне это проявляется чрезмерным вовлечением в воспалительный процесс циркулирующих компонентов иммунной системы [1, 2, 3, 4, 5]. Воздействие SARS-CoV-2 на иммунную систему приводит к гиперактивации иммунного ответа, переходящей в иммуносупрессию, проявляющуюся сепсисом [3, 6, 7, 8]. Опасность диссеминации инфекционного агента и развития тяжелого системного процесса связана прежде всего с поражением легких. Присоединение к бронхопневмонии и альвеолиту инфекционного тромботического микроваскулита не только образует субстрат дыхательной недостаточности, но и создает опасность выхода вирусов в кровоток. Развивается вирусный сепсис, а воспалительный тромбоз повреждает новые участки сосудистого русла. В связи с этим или в результате непосредственной вирусной инвазии в патологический процесс вовлекаются многие ткани и органы. Наступает перелом в течении заболевания, означающий генерализацию инфекции [2, 3, 4, 5, 6]. В связи с несомненной актуальностью проблемы, приводим клинический случай развития вирусно-бактериальной пневмонии, вызванной SARS-CoV-2 и *Klebsiella pneumoniae*, осложненной генерализованным распространением инфекции с раз-

витием септицемии при сопутствующих заболеваниях со стороны сердечно-сосудистой и центральной нервной систем и желудочно-кишечного тракта.

Описание клинического случая

Больной А.И., 04.09.1962 г. рожд., 58 лет, в течение нескольких часов 06.09.2022 г. находился на стационарном лечении в инфекционном отделении БУ «Новочебоксарская городская больница» Минздрава Чувашии. Поступил в сопровождении бригады скорой медицинской помощи в тяжелом состоянии. Со слов сына с ночи 05.09.2022 и до обеда 06.09.2022 больной предъявлял жалобы на разлитую боль в брюшной полости, отмечались лихорадка гектического характера и однократная рвота. Принимал кеторол, спазган. Наблюдалось кратковременное улучшение в виде уменьшения интенсивности болей, которые, однако, спустя некоторое время приняли схваткообразный характер. Помимо этого, имел место кашель, пациент отмечал чувство нехватки воздуха. Была вызвана бригада скорой медицинской помощи.

Компьютерная томография органов грудной клетки, выполненная при поступлении в стационар, выявила признаки двусторонней вирусной интерстициальной пневмонии с площадью поражения 51% и участками консолидации, двусторонний гидроторакс. Диагноз «COVID-19V был подтвержден при исследовании назофарингеального мазка методом ПЦР.

Из анамнеза известно, что пациент наблюдался по поводу цереброваскулярной болезни (ЦВБ) — дисциркуляторной энцефалопатии 1–2 степени сложного генеза (гипертонического, атеросклеротического) с цефалгией и вестибулярным синдромом (данные амбулаторной карты). Периодически принимал антигипертензивные препараты при повышении АД выше 150/110 мм рт.ст. По данным УЗИ от 18.03.2013 г. поджелудочная железа уменьшенных размеров: размер головки — 25 (норма до 35) мм, тела — 15 (норма до 25) мм, хвоста — 27 (норма до 20) мм, с волнистыми нечеткими контурами. Эхогенность неравномерно диффузно повышена). Был выставлен диагноз «Хронический панкреатит». Пациенту было назначено лечение — полиферментные препараты, при болях был рекомендован прием дротаверина, при вздутии живота — эспумизан. Периодически проходил курсовое лечение. В 2018 г. после погрешности в диете, наблюдались схваткообразные боли, тошнота, рвота. Получал стационарное лечение по поводу хронического индуративного панкреатита и с положительной динамикой был выписан.

В течение последних 14 дней (примерно с середины августа) отмечал повышенную температуру тела в пределах 37,3–37,8°С, принимал парацетамол. Наблюдалось усиление болей в области левого подреберья, неоднократная рвота. В последние 3–4 дня температура тела была в пределах 37,8–38,3°С, появилась общая слабость, сухой кашель, был начат прием противовирусных препаратов, но улучшения самочувствия больной не отмечал.

Объективно: при поступлении температура тела 38,8°С, движения в конечностях ограничены, чувствительность не нарушена. Зрачки: d = s = 4 мм. Органы дыхания: при пальпации грудной клетки болезненность не определялась. При аускультации: дыхание жесткое, ослаблено в нижних отделах, хрипы. Частота дыхания — 36 в минуту, SaO_2–56%. Сердечно-сосудистая система: тоны сердца приглушены, глухие, ЧСС — 76 в минуту. Пульс на *arteria radialis* удовлетворительного наполнения и напряжения, АД — 93/50 мм рт.ст. При глубокой пальпации отмечалась разлитая болезненность и напряжение мышц передней брюшной стенки. Оценка состояния по шкале NEWS2 — 11 баллов.

Общий анализ крови: лейкоциты — 19,8 × 10^9/л, эритроциты — 3,27 × 10^{12}/л, гемоглобин — 121 г/л, тромбоциты — 323 × 10^9/л, нейтрофилы — 98 × 10^9/л, лимфоциты — 9 × 10^9/л, моноциты — 1,0 × 10^9/л, СОЭ — 78 мм/ч.

Биохимический анализ крови: мочевина — 3,5 ммоль/л, билирубин общий — 46,5 мкмоль/л, АСТ — 72,0 ед/л, креатинин — 65,0 мкмоль/л, хлориды — 102,0 ммоль/л, калий — 3,5 ммоль/л, натрий — 140,6 ммоль/л, железо — 8,9 мкмоль/л, С-реактивный белок — 136 мг/л, амилаза крови — 453,0 ед/л, лактатдегидрогеназа — 538,0 ед/л, ГГТП — 155,0 ед/л, глюкоза крови — 3,79 ммоль/л, прокальцитонин — 2 нг/мл.

Коагулограмма: D-димер — 786,00 нг/мл, АЧТВ — 39 с, протромбиновый индекс — 127,4%, МНО — 2,78, фибриноген — 9,2 г/л, протромбиновое время — 15,2 с.

Результат УЗИ органов брюшной полости: диффузные изменения паренхимы печени и поджелудочной железы, неоднородность парапанкреатической клетчатки. Визуализировались признаки абсцесса в виде неоднородного скопления, взвеси объемом 15 мл, не имеющей четкой капсулы, лоцирован в инфильтрированной брыжейке тонкой кишки. Выпот в брюшной полости.

ЭхоКГ: атеросклероз аорты, аортального клапана (АК), митрального клапана (МК). Кальциноз АК и фиброзного кольца (ФК) АК 1 степени. Аортальная недостаточность 0–1 степени. Кальциноз МК и ФК МК 1 степени. Митральная недостаточность 1–2 степени. Диастолическая дисфункция левого желудочка 1 типа. Увеличение полости левого предсердия. Трикуспидальная регургитация 1–2 степени. Пульмональная регургитация 1 степени.

Легочная гипертензия 1 степени. Расширение ствола легочной артерии. Аневризма межпредсердной перегородки (МПП).

Несмотря на начатое лечение, внезапно начался кашель с выделением розоватой мокроты, клокочущее дыхание и наступил летальный исход. Выставлен клинический диагноз: Новая коронавирусная инфекция COVID-19 (вирус идентифицирован), тяжелое течение. Конкурирующее заболевание: Острый парапанкреатит. Абсцесс брыжейки тонкого кишечника. Осложнения основного заболевания: Двусторонняя вирусная интерстициальная пневмония (поражение легочной паренхимы — 51%). ОРДС. Двусторонний гидроторакс. Разлитой гнойно-фибринозный перитонит, токсическая фаза. Септицемия (SOFA — 2 балла, прокальцитонин = 2 нг/мл). Синдром полиорганной недостаточности (церебральная, сердечно-сосудистая, почечная). Сопутствующий диагноз: ЦВБ: Дисциркуляторная энцефалопатия 1–2 степени сложного генеза (гипертонического, атеросклеротического характера). Атеросклероз аорты, АК, МК. Кальциноз АК и ФК АК 1 степени. Аортальная недостаточность 0–1 степени. Кальциноз МК и ФК МК1 степени. Митральная недостаточность 2 степени. Легочная гипертензия 1 степени. Аневризма МПП. Скорость клубочковой фильтрации 54 мл/мин/1,73 м^2.

На патологоанатомическом вскрытии обнаружены признаки двусторонней вирусно-бактериальной пневмонии, при макроскопическом исследовании легкие с участками неравномерного уплотнения, местами до печеночной плотности. При гистологическом исследовании: альвеолы неравномерно расширены, в просвете — отечная жидкость, серозно-фибринозный экссудат, десквамированные альвеолоциты в просвете альвеол, полнокровие капилляров, участки дистелектаза (рис. 1, II обложка), воспалительный экссудат с признаками организации (рис. 2, II обложка). Межальвеолярные перегородки полнокровны, с очагами некрозов, выявляются микроабсцессы, имеются участками пневмосклероза с выраженным полнокровием сосудов. Отмечается перибронхиальный и периваскулярный склероз. Эпителий части бронхов десквамирован в просвет.

В сердце выявляется гипертрофия миокарда левого желудочка (толщина — 1,8 см, масса сердца — 340 г). При гистологическом исследовании: разрыхленно-набухший эпикард, выраженный отек интерстиция, мышечные волокна фрагментированы, кардиомиоциты неравномерно гипертрофированы, отмечается мелкосетчатое разрастание соединительной между мышечными волокнами (рис. 3, II обложка).

В поджелудочной железе и парапанкреатической клетчатке отмечено уплотнение, при макроскопическом исследовании структура не просматривается за счет тяжистых структур и полостных элементов диаметром 0,5 × 1,0 см, заполненных содержимым серо-зеленого цвета (гной), в брыжейке тонкой кишки полость в диаметре до 5 см, заполненный «гноем» серо-зеленого цвета. В брюшной полости отмечается картина разлитого гнойно-фибринозного перитонита. При гистологическом исследовании: выраженный перидуктальный, междольковый и внутридольковый склероз поджелудочной железы; сохранившаяся паренхима — в виде островков, окруженных фиброзно-жировой тканью, среди которой видны очаговые нейтрофильные инфильтраты (рис. 4, 5, 6, III обложка). В почках — некроз эпителия канальцев (рис. 7, III обложка).

В лимфоидной и кроветворной ткани отмечалась гиперплазия (в лимфоидной ткани наблюдалось появление незрелых форм клеток гемопоэза). Выявлялись васкулиты (токсико-аллергические с фибриноидными изменениями стенок сосудов) и межуточное воспаление в паренхиматозных органах.

Результат вирусологического исследования секционного материала (ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Чувашской Республике — Чувашии», лаборатория вирусологических исследований и диагностики особо опасных инфекций»): РНК коронавируса SARS-CoV-2 обнаружена в легком, головном мозге, сердце, поджелудочной железе. Результат микробиологического исследования ткани легкого (лаборатория БУ «Новочебоксарская ГБ» МЗ Чувашии): обильный рост *Klebsiella pneumoniae*. Выставлен патологоанатомический диагноз. Основное заболевание: Новая коронавирусная инфекция COVID-19. Конкурирующее заболевание: Хронический индуративный панкреатит, острый парапанкреатит, стеатонекрозы парапанкреатической клетчатки. Сепсис, септицемия (результат микробиологического исследования крови (лаборатория БУ «Новочебоксарская ГБ» МЗ Чувашии): обильный рост *Klebsiella*). Абсцесс брыжейки тонкого отдела кишечника. Осложнения основного заболевания: Двусторонняя вирусно-бактериальная пневмония (результат микробиологического исследования (лаборатория БУ «Новочебоксарская ГБ» МЗ Чувашии): обильный рост *Klebsiella pneumoniae*). Разлитой гнойно-фибринозный перитонит. Отек легких. Отек головного мозга. Острая легочно-сердечная недостаточность. Двусторонний некронефроз. Сопутствующие заболевания: Атеросклероз артерий сердца, головного мозга. Гипертоническая болезнь: гипертрофия миокарда левого желудочка (1,8 см), периваскулярный кардиосклероз. Хронический бронхит, перибронхиальный пневмосклероз.

На основании данных медицинской документации, результатов патологоанатомического и лабораторного исследования следует, что причиной смерти больного А.И. 58 лет стала новая коронавирусная инфекция COVID-19, вызвавшая двустороннюю вирусную пневмонию с присоединением бактериальной микрофлоры, осложненная острой респираторной недостаточностью. Также имело место генерализованное распространение инфекции с развитием септицемии и полиорганной недостаточности (легочно-сердечной, церебральной, почечной).

Обсуждение

В литературе описываются данные о развитии сепсиса после инфицирования SARS-CoV-2, но клинико-морфологическое течение разных вариантов сепсиса — септицемии, септикопиемии, септического бактериального эндокардита — отсутствует. В связи с этим представленный случай имеет особую актуальность. Прогрессирующее развитие синдрома полиорганной недостаточности при сепсисе затрагивает легкие, сердце, печень, почки и головной мозг. Определенные факторы, в том числе возраст и сопутствующие болезни, способствуют функциональной декомпенсации органов в период сепсиса. В представленном случае после инфицирования SARS-CoV-2 развилась вирусно-бактериальная пневмония, обусловленная *Klebsiella pneumoniae*. *Klebsiella pneumoniae* считается относительно редко встречающимся возбудителем. В экспериментальных исследованиях была установлена значимость фоновых заболеваний, предрасполагающих к пневмонии, таких как ожирение, сахарный диабет, вирусная инфекция [5, 6]. К патогенетическим механизмам, участвующих в легочном воспалении, относятся: нарушение микроциркуляции в очаге поражения, нарушение в системе гуморального и клеточного иммунитета, гипоксия. Для инфекционного поражения легких наиболее характерна респираторно-циркуляторная гипоксия в результате нарушения оптимального вентиляционно-перфузионного соотношения, снижения интенсивности диффузии газов через альвеолокапиллярную мембрану при сохранении перфузии невентилируемых воспаленных участков легких. Кроме того, кровь из выключенных из газообмена легочных участков смешивается с кровью из хорошо вентилируемых областей, что приводит к развитию гипоксемии. Циркуляторный компонент гипоксии проявляется в случае среднетяжелого и тяжелого течения пневмонии в условиях развития сердечно-сосудистой недостаточности и расстройств микроциркуляции. Гипоксия при этом может быть результатом массовой гибели микроорганизмов и высвобождения эндотоксинов в результате высокой индивидуальной чувствительности к действию терапевтических лекарственных средств. И наконец, при пневмонии возможно развитие тканевой гипоксии, что по мере исчерпания возможностей защитного реагирования, основу которого будет составлять экономная утилизация кислорода клетками, снижение интенсивности окислительного фосфорилирования и торможение биосинтеза метаболитов пластического обмена, приведет к нарушению функций жизненно важных органов и систем.

Вероятно, на фоне вирусной интерстициальной пневмонии имеет место иммуноопосредованный воспалительный процесс с реакцией в поджелудочной железе и активацией панкреатических ферментов с развитием острого парапанкреатита, стеатонекроза парапанкреатической клетчатки.

Заключение

В представленном случае имелись признаки септицемии после инфицирования SARS-CoV-2: отмечались сохранившиеся островки поджелудочной железы, окруженные фиброзно-жировой тканью, среди которой видны были очаговые нейтрофильные инфильтраты. В лимфоидной и кроветворной ткани отмечалась гиперплазия (в лимфоидной ткани наблюдалось появление незрелых форм клеток гемопоэза). Выявлялись васкулиты (токсико-аллергические с фибриноидными изменениями стенок сосудов) и межуточное воспаление в паренхиматозных органах.

Список литературы/References

1. Воробьева О.В. Изменения в органах при инфицировании COVID-19 с развитием септикопиемии // Профилактическая медицина. 2021. Т. 24, № 10. С. 89–93. [Vorobyeva O.V. Changes in organs in COVID-19 infection with septicopyemia. *Profilakticheskaya meditsina = The Russian Journal of Preventive Medicine, 2021, vol. 24, no. 10, pp. 89–93. (In Russ.)*] *doi: 10.17116/profmed20212410189*
2. Воробьева О.В., Ласточкин А.В. Патоморфологические изменения в органах при COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 3. С. 587–590. [Vorobeva O.V., Lastochkin A.V. Organ-specific pathomorphological changes during COVID-19. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity. 2020, vol. 10, no. 3, pp. 587–590. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-PCI-1483*
3. Зиганшин А.М., Мулюков А.Р. Механизмы иммунопатологии сепсиса вирусной этиологии при COVID-19 // Сибирское медицинское обозрение. 2021. № 6. С. 35–43. [Ziganshin A.M., Mulykov A.R. Immunopathological mechanisms in sepsis of viral etiology in COVID-19. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie = Siberian Medical Review, 2021, no. 6, pp. 35–43. (In Russ.)*] *doi: 10.20333/25000136-2021-6-35-43*

4. Хирманов В.Н. COVID-19 как системное заболевание // Клиническая фармакология и терапия. 2021. Т. 30, № 1. С. 5–15. [Khirmanov V.N. COVID-19 as a systemic disease. *Klinicheskaya farmakologiya i terapiya = Clinical Pharmacology and Therapy, 2021, vol. 30, no. 1, pp. 5–15. (In Russ.)]. doi: 10.32756/0869-5490- 2021-1-5-15*
5. Фесенко О.В., Швайко С.Н. Пневмонии, вызванные Klebsiella pneumoniae (фридлендеровские пневмонии) // Практическая пульмонология. 2019. № 1. С. 22–31. [Fesenko O.V., Shvaiko S.N. Pneumonia caused by Klebsiella pneumoniae (Friedländer pneumonia). *Prakticheskaya pul'monologiya = Practical Pulmonology, 2019, no. 1, pp. 22–31. (In Russ.)*]
6. Ballinger M.N., Standiford T.J. Postinfluenza bacterial pneumonia: host defenses gone awry. *J. Interferon Cytokine Res., 2010, vol. 30, no. 9, pp. 643–652. doi: 10.1089/jir.2010.0049*
7. Perico L., Benigni A., Casiraghi F., Ng L.F.P., Renia L., Remuzzi G. Immunity, endothelial injury and complement-induced coagulopathy in COVID-19. *Nat. Rev. Nephrol., 2020, vol. 17, no. 1, pp. 46–64. doi: 10.1038/s41581-020-00357-4*
8. Yang X., Cheng X., Tang Y., Qiu X., Wang Z., Fu G., Wu J., Kang H., Wang J., Wang H., Chen F., Xiao X., Billiar T.R., Lu B. The role of type 1 interferons in coagulation induced by Gram-negative bacteria. *Blood, 2020, vol. 135, no. 14. pp. 1087–1100. doi: 10.1182/blood.2019002282*

Авторы:

Романова Л.П., к.б.н., доцент кафедры дерматовенерологии с курсом гигиены ФГБОУ ВО Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова, г. Чебоксары, Россия.

Воробьева О.В., к.м.н., доцент кафедры общей и клинической морфологии и судебной медицины ФГБОУ ВО Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова, г. Чебоксары, Россия.

Authors:

Romanova L.P., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Dermatovenerology and Hygiene, Chuvash State University named after I.N. Ulyanov, Cheboksary, Russian Federation.

Vorobeva O.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of General and Clinical Morphology and Forensic Medicine, I.N. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Russian Federation.

Поступила в редакцию 15.09.2022
Принята к печати 25.02.2023

Received 15.09.2022
Accepted 25.02.2023

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства **(http://iimmun.ru)** в соответствии с требованиями журнала «Инфекция и иммунитет» и «Инструкцией для авторов», представленной на сайте. С февраля 2016 года журнал «Инфекция и иммунитет» публикует статьи на двух языках (русском и английском).

Основные виды статей, публикуемых в журнале

Оригинальная статья

Статья должна описывать результаты законченного исследования. Допускается объем статьи до 20 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы. Статья должна содержать: 1) введение; 2) материалы и методы; 3) результаты исследований; 4) обсуждение результатов; 5) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками.
- Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т.д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел **«Благодарности»** не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано ниже (см. «Подготовка статей»). Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции.

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Описание статьи из журнала:

Салина Т.Ю., Морозова Т.И. Иммунологические методы в дифференциальной диагностике // Туберкулез и болезни легких. 2011. Т. 88, № 11. С. 50–53.

Salina T.Yu., Morozova T.I. Immunological methods in differential diagnostics. Tuberculosis and Lung Diseases, 2011, vol. 88, no. 11, pp. 50–53.

Описание статьи из книги (монографии):

Шурыгина И.А., Чеснокова М.В., Климов В.Т. Псевдотуберкулез. Новосибирск: Наука, 2003. 320 с.

Shurygina I.A., Chesnokova M.V., Klimov V.T. Pseudotuberculosis. Novosibirsk: Nauka, 2003. 320 p.

Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Turenne C.Y., Wallace R., Behr M.A. Mycobacterium avium in the postgenomic era. Clin. Microb. Rev., 2007, vol. 20, no. 2, pp. 205–229.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G. Appleton & Lange, 1994, pp. 66–79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. Не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL», а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli, Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения, регламентированного международными правилами (с, ч, см, мл, мг, kDa и т.д.).

Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, т.е. ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором.

Размеры иллюстраций:

- максимальная высота — 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца — 82 мм, для 2 столбцов — 170 мм

Таблицы. Каждая таблица предоставляется отдельным файлом. Таблицы нумеруются арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

Рисунки (графики и фотографии). В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их включения в текст статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка в отдельный файл. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Названия рисунков и примечаний к ним, нарисуночные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tif (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Инфекция и иммунитет» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

Подготовка статей

При предоставлении статьи авторы должны руководствоваться требованиями, приведенными в нижеследующих пунктах. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

1. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Так же авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Инфекция и иммунитет» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации или книги. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
2. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
3. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
   1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
      - фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках);
      - название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах);
      - почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках);
      - телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail;
      - фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности;
      - полное название статьи, направляемой в редакцию;
      - количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц;
      - раздела журнала, для которого предназначена данная работа: «Лекции», «Обзоры», «Оригинальные статьи», «Краткие сообщения», «В помощь практическому врачу»;
      - дата отправления работы.
   2) Отсканированная копия файла с метаданными подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»).

3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:
   - название статьи (без использования каких-либо сокращений, на русском и английском языках);
   - фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность каждого из соавторов статьи (полностью, на русском и английском языках);
   - подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа; в случае, если авторами статьи являются сотрудники разных учреждений, то последние нумеруются по порядку, начиная с единицы, и соответствующая цифра размещается после фамилии автора, представляющего данное учреждение; для маркировки авторов в англоязычной части статьи вместо цифр используются латинские буквы (a, b, c, d и т.д.);
   - сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания, на русском и английском языках);
   - не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
   - адрес для переписки с указанием номера телефона, факса и адреса e-mail.
4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.
5) Рисунки, если они есть — каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок_Порядковый номер рисунка. Название рисунка»).
6) Файл в формате .doc, .docx, .rtf со списком, в котором указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные.
7) Таблицы, если они есть — каждая отдельным файлом (название каждой таблицы должно быть приведены заголовком в файле с самой таблицей).
8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература») в виде таблицы из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	**Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные**	**Ф.И.О., название публикации и источника на английском языке**	**Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи и/или ее DOI**
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована — для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий, редакция просит предоставлять их перевод, обозначая его красным цветом шрифта. **Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк**	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в т.ч. системы **www.e-library.ru**. DOI статьи приводится в квадратных скобках после URL-адреса

4. Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.
5. Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.
6. Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала **(http://iimmun.ru)** в рубрике **«Рецензирование»** раздела **«О журнале»**.

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

Иллюстрации к статье «Клинический случай развития вирусно-бактериальной пневмонии, вызванной SARS-CoV-2 и *Klebsiella pneumoniae*, осложненной генерализованным распространением инфекции с развитием септицемии» (авторы: Л.П. Романова, О.В. Воробьева) (с. 391–396)

Illustrations for the article "A clinical case of viral-bacterial pneumonia caused by SARS-CoV-2 and *Klebsiella pneumoniae*, complicated by a generalized infection with developed septicemia" (authors: Romanova L.P., Vorobeva O.V.) (pp. 391–396)

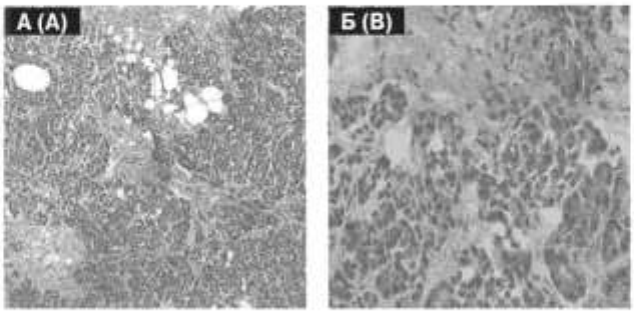


Рисунок 4. Микроскопическая картина склерозирующей ткани между панкреоцитами. Окраска гематоксилином и эозином, ×400 (А), ×900 (Б)

Figure 4. Microscopic picture of sclerosing tissue between pancreocytes. Stained with hematoxylin and eosin, ×400 (A), ×900 (B)

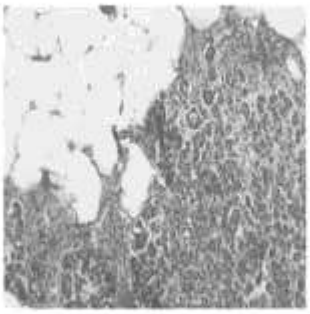


Рисунок 5. Микроскопическая картина липоматоза, фиброза поджелудочной железы с участками воспалительной инфильтрации. Окраска гематоксилином и эозином, ×900

Figure 5. Microscopic picture of lipomatosis, fibrosis of the pancreas with areas of inflammatory infiltration. Stained with hematoxylin and eosin, ×900

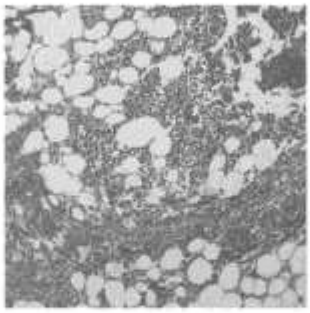


Рисунок 6. Микроскопическая картина воспалительной инфильтрации парапанкреатической клетчатки. Окраска гематоксилином и эозином, ×900

Figure 6. Microscopic picture of inflammatory infiltration of parapancreatic tissue. Stained with hematoxylin and eosin, ×900

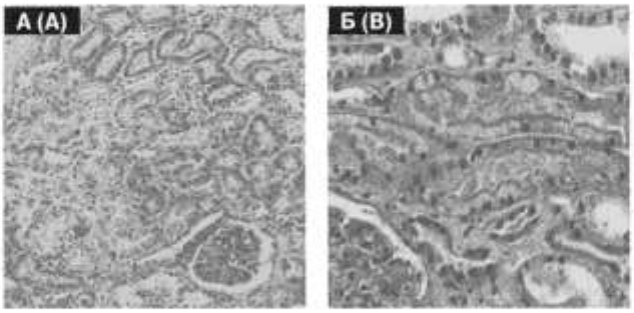


Рисунок 7. Микроскопическая картина некроза эпителия канальцев почек. Окраска гематоксилином и эозином, ×400 (А), ×900 (Б)

Figure 7. Microscopic picture of necrosis of the epithelium of renal tubules. Stained with hematoxylin and eosin, ×400 (A), ×900 (B)