Том 12, № 2. С. 201–400
2022

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

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
2022, том 12 **№ 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) 232-07-42.
E-mail: izdatelstvo@pasteurorg.ru

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

Подписано в печать 18.04.2022 г. Формат 60 x 90 1/8.
Печать офсетная. Усл.-печ. л. 25.
Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.).
Заказ № 1111

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

2022, volume 12 **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.
Тел.: (812) 233-08-58.

Publishing House of St. Petersburg Pasteur Institute
197101, St. Petersburg, Mira str., 14.
Phone/fax: (812) 232-07-42.
E-mail: izdatelstvo@pasteurorg.ru

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

Passed for printing 18.04.2022. 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

CONTENTS

Reviews

Original articles

Short communications

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2022, vol. 12, no. 2, pp. 209–221

Инфекция и иммунитет
2022, Т. 12, № 2, с. 209–221

ПРОТЕИНЫ ЛЕКТИНОВОГО ПУТИ АКТИВАЦИИ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА: ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ, ГЕНЕТИКА И УЧАСТИЕ В ПАТОГЕНЕЗЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА

М.В. Смольникова, С.Ю. Терещенко

НИИ медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН, г. Красноярск, Россия

Резюме. Система комплемента является древнейшим компонентом врожденного иммунитета, основной функцией которого является преимущественно интраваскулярная элиминация бактериальных агентов. Кроме того, протеины комплемента играют роль своеобразного моста между системами врожденного и адаптивного иммунитета, обеспечивая адекватные условия для созревания и дифференциации В- и Т-лимфоцитов. Система комплемента состоит из плазменных протеинов и мембранных рецепторов. Плазменные протеины взаимодействуют между собой тремя известными каскадными путями — лектиновым (наиболее филогенетически древним), альтернативным и классическим. Лектины — общий термин протеинов, формирующих отдельное суперсемейство паттерн-распознающих рецепторов, способных к распознаванию и агрегации молекул олиго- и полисахаридной природы. Среди всех лектинов уникальными функциями формирования комплексов с углеводными компонентами микробной стенки обладают фиколины (FCN) (общий домен — фибриноген) и коллектины (общий домен — коллаген) — маннозосвязывающий лектин (MBL), печеночный и почечный коллектины. Образование сложного комплекса «полисахариды микробной стенки + коллектин/фиколин + специфические маннозосвязывающие лектин-ассоциированные сериновые протеазы (MASP)» приводит, в итоге, к активации системы комплемента, воспалительной реакции и элиминации бактерии. Такой путь активации называется лектиновым, в отличие от двух других путей — классического и альтернативного. Изучение роли системы комплемента и врожденных дефектов протеинов в патогенезе различных заболеваний крайне актуально в связи с тем, что врожденные дефициты компонентов комплемента составляют не менее 5% от общего числа первичных иммунодефицитов, тогда как аспекты их распространенности и патогенеза остаются неизученными. Актуальность изучения компонентов системы комплемента для различных популяций значительна, учитывая накапливающиеся доказательства важной роли лектинового пути в отношении вирусных инфекций. Лектины, основные протеины лектинового пути активации комплемента, кодируются полиморфными генами, точечные мутации (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) в которых приводят к изменению конформации и экспрессии белка, что в свою очередь имеет отражение на функциональности и способности отвечать на патоген. Распределение частот полиморфных генов лектинов и их гаплотипов имеет крайне выраженные популяционные различия. Согласно анализу доступных нам литературных данных,

Адрес для переписки:
Смольникова Марина Викторовна
660022, Россия, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3г, НИИ медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН.
Тел.: 8 391 228-06-81.
E-mail: smarinv@yandex.ru

Contacts:
Marina V. Smolnikova
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk, Partizana Zheleznyaka str., 3g, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences.
Phone: +7 391 228-60-83.
E-mail: smarinv@yandex.ru

Для цитирования:
Смольникова М.В., Терещенко С.Ю. Протеины лектинового пути активации системы комплемента: иммунобиологические функции, генетика и участие в патогенезе заболеваний человека // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 2. С. 209–221. doi: 10.15789/2220-7619-POT-1777

Citation:
Smolnikova M.V., Tereshchenko S.Yu. Proteins of the lectin pathway of the complement system activation: immunobiological functions, genetics and involvement in the pathogenesis of human diseases // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 2, pp. 209–221. doi: 10.15789/2220-7619-POT-1777

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-POT-1777

в настоящее время популяционные частоты мутаций, в том числе ассоциированных с врожденными дефицитами компонентов лектинового пути малочисленны или не изучены, поэтому в данной работе приведен обзор основных лектинов и их функции, изученных функционально значимых мутаций в различных популяциях и их патогенетической значимости для защитных функций организма.

Ключевые слова: *система комплемента, лектины, MBL, FCN, MASP, полиморфизм, этнические отличия.*

PROTEINS OF THE LECTIN PATHWAY OF THE COMPLEMENT SYSTEM ACTIVATION: IMMUNOBIOLOGICAL FUNCTIONS, GENETICS AND INVOLVEMENT IN THE PATHOGENESIS OF HUMAN DISEASES

Smolnikova M.V., Tereshchenko S.Yu.

Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. The complement system is the most ancient components in the innate immunity, mainly functioning to primarily eliminate bacterial agents intravascularly. Moreover, the complement complex proteins play a role as a "bridge" between the systems of innate and adaptive immunity providing adequate conditions for maturation and differentiation of B- and T-lymphocytes. The complement system consists of plasma proteins and membrane receptors. Plasma proteins interact with each other via the three described cascade pathways — lectin (which is most ancient phylogenetically), alternative and classical. Lectins are proteins comprising a separate superfamily of pattern-recognizing receptors able to sense molecules of oligo- and polysaccharide nature and induce their aggregation. Among all the lectins, ficolins (FCN) (common domain — fibrinogen) and collectins (common domain — collagen) — mannose-binding lectin (MBL), hepatic and renal collectins have exert unique functions by complexing with carbohydrate components of microbial wall. Formation of a compound complex "microbial wall polysaccharides + collectin/ficolin + specific mannose-binding lectin-associated serine proteases (MARP)" results in the complement system activation, inflammatory reaction and bacterium elimination. Such scenario is proceeded along the lectin pathway compared to the two other pathways called classical and alternative. Examining a role of the complement system and congenital protein defects in the pathogenesis of various diseases is of topical interest because inborn deficiency of the complement components comprises at least 5% out of total primary immunodeficiency rate, whereas the aspects of their prevalence and pathogenesis remain unexplored. Relevance of investigating the complement system components for diverse populations is tremendous, taking into consideration accumulated evidence regarding an important role of the lectin pathway in viral infections. Lectins, the main proteins in the lectin pathway of the complement activation, are encoded by polymorphic genes, wherein single nucleotide polymorphisms (SNPs) result in altered protein conformation and expression, which, in turn, affects functionality and potential to respond to a pathogen. The distribution of the lectin polymorphic gene frequencies and their haplotypes displays extremely marked population differences. According to analyzing available data, population SNP frequencies including those associated with inborn deficiencies for components of the lectin pathway have been currently scarce or unexplored. hence, here we review major lectins and their functions, their functionally significant SNPs in diverse populations and their pathogenetic importance for host defense functions.

Key words: *complement, lectins, MBL, FCN, MASP, polymorphism, ethnic differences.*

Иммунная система классически делится на врожденную и адаптивную, которые представляют собой сложные системы взаимодействий множества белков и рецепторов, связанных друг с другом. Врожденная иммунная система обеспечивает немедленную неспецифическую первую линию защиты посредством гуморальных, клеточных и механических процессов, играя жизненно важную роль в защите от патогенного воздействия [31]. Система комплемента (СК) является древнейшим компонентом врожденного иммунитета, основной функцией которого является ликвидация инфекционных агентов и собственных клеток организма человека. Система комплемента состоит более чем из нескольких десятков белков плазмы, рецепторов на поверхности клеток и регуляторных белков. После протеолитического расщепления неактивные молекулы активируются, что приводит к ряду эффекторных функций, включая фагоцитоз, воспаление, лизис клеток [76]. Кроме того, протеины комплемента создают связь между системами врожденного и адаптивного иммунитета, обеспечивая нормальные условия для созревания и дифференциации В- и Т-лимфоцитов. Эффективная работа системы комплемента зависит от баланса регуляторных и активационных механизмов, направленных на уничтожение вторгающихся микроорганизмов и ограничение повреждения клеток и тканей хозяина [99].

В последние годы изучению роли врожденных дефектов системы комплемента в патогенезе различных заболеваний — от инфекционных и вирусных до аутоиммунных и кардиометаболических — в мировой литературе уделяется значительное внимание. Так, в документе Европейской ассоциации по изучению имму-

нодефицитных состояний (European Society for Immunodeficiencies, ESID) от 2020 г., специально посвященному обобщению современного состояния проблемы дефицитов различных компонентов комплемента, утверждается, что такие врожденные дефекты составляют не менее 5% общего числа первичных иммунодефицитов, а многие аспекты их распространенности и патогенеза остаются неизученными [21]. Плазменные протеины СК взаимодействуют между собой тремя известными путями — лектиновым (наиболее филогенетически древним), альтернативным и классическим.

Все три пути комплемента инициируются множеством стимулов независимо друг от друга, и впоследствии протеолитические каскады сходятся к активации основного компонента С3, что приводит к сборке мембраноатакующего комплекса [15]. Лектиновый путь (ЛП) может активироваться в отсутствие иммунных комплексов и инициироваться путем связывания молекул суперсемейства паттерн-распознающих рецепторов (лектинов), таких как маннозосвязывающий лектин (MBL), коллектин 11 (CL-K1) или фиколины, с углеводами или ацетилированными остатками, присутствующими на поверхности патогенов или собственных апоптотических/опухолевых клеток [6]. Циркулирующие MBL, CL-K1 и фиколины образуют комплексы со специфическими сериновыми протеазами (Mannose-Binding lectin-associated Serine Protease, MASP): MASP-1 и MASP-2. После связывания комплексов MBL/MASP, CL-K1/MASP или фиколин/MASP с их мишенями, MASP-1 может автоматически активироваться и запустить MASP-2 [41], приводя к расщеплению С4 и С2. Это обеспечивает сборку конвертаз С3 и С5 с их последующей активацией и генерацией, соответственно, С3а и С5а — двух провоспалительных анафилатоксинов, которые усиливают воспалительную реакцию. Таким образом, образование сложного комплекса «полисахариды микробной стенки + коллектин/фиколин + специфические протеазы (MASP-1, MASP-2 и MASP-3)» приводит к активации ЛП системы комплемента, воспалительной реакции и элиминации бактерии (рис.).

В данном обзоре объединена информация о функциях и дефицитах белков ЛП активации системы комплемента, об их взаимодействии друг с другом и участии в патогенезе заболеваний человека. Кроме этого описаны гены этих протеинов, их полиморфизм, функциональные мутации и гаплотипические особенности, влияющие на иммунный ответ в целом, а также на авидность и ответ организма на патоген/инфекционный агент. Обзор будет полезен для иммунологов, инфекционистов, вирусологов, генетиков, молекулярных биологов, терапевтов.

Протеины лектинового пути системы комплемента

Маннозосвязывающий лектин (MBL)

Маннозосвязывающий лектин — это центральная молекула распознавания ЛП, синтезируемая в клетках печени и секретируемая в кровоток в виде высокомолекулярных мультимерных комплексов [49]. Молекула MBL состоит из нескольких субъединиц и склонна

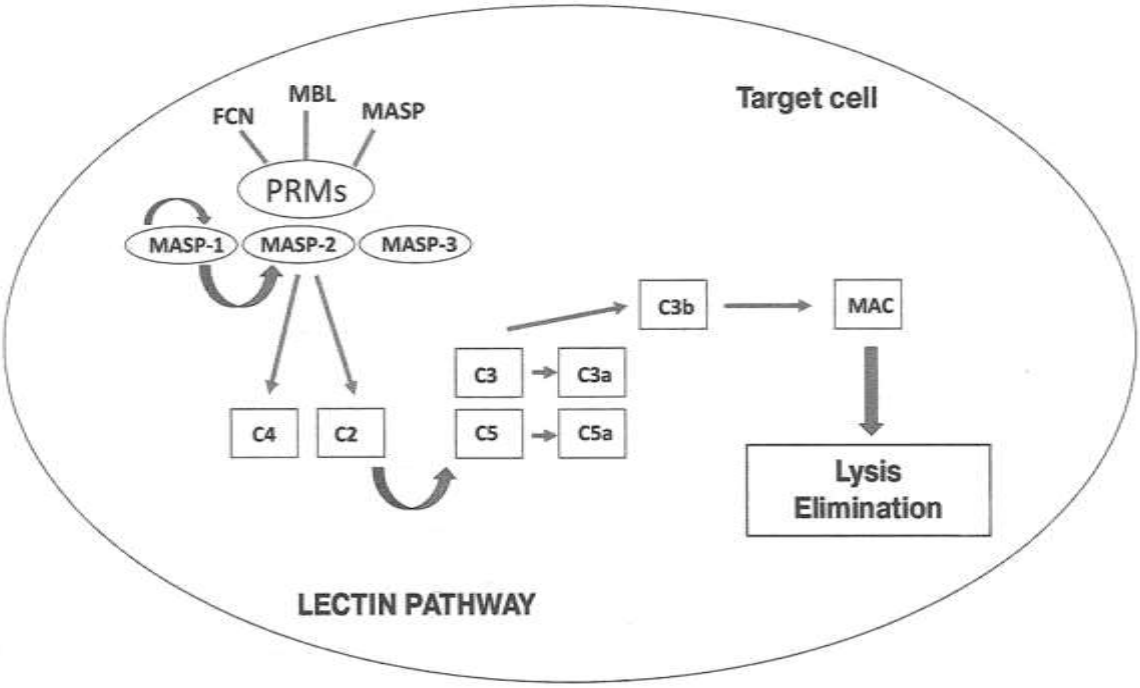

Рисунок. Схема лектинового пути активации системы комплемента
Figure. A scheme depicting lectin pathway of the complement system activation

к образованию димеров, тримеров и тетрамеров. Способность к олигомеризации генетически обусловлена и повышает активность MBL в отношении связывания полисахаридов бактерий и активации комплемента [51]. MBL является членом семейства белков-коллектинов и известен как лектин С-типа из-за способности распознавать не только маннозу, но и фрагменты сахаров Ca^{2+}-зависимым образом. Его также называют «защитным коллагеном» из-за важной роли во врожденном иммунитете и элиминации патогенов [16]. Маннозосвязывающий лектин распознает повторяющиеся массивы углеводных структур на патогенных организмах, таких как вирусы, бактерии, грибы, простейшие и многоклеточные паразиты, а также на апоптотических/опухолевых клетках [7, 48, 55, 56, 72]. После связывания с мишенями MBL вызывает несколько биологических эффектов, таких как активация комплемента лектиновым путем, опсонофагоцитоз, модуляция воспаления и распознавание измененных собственных структур [88]. Кроме того, MBL может модулировать продукцию цитокинов как на уровне мРНК, так и на уровне белка [50]. MBL считается протеином острой фазы [34], уровни которого могут увеличиваться в несколько раз во время острофазового ответа, в основном из-за повышающейся регуляции медиаторами острой фазы [9]. Уровни MBL в сыворотке колеблются от нескольких нанограмм на миллилитр до более 10 мкг/мл со средним значением около 0,8 мкг/мл [54], что в значительной степени зависит от генетического полиморфизма кодирующего его гена *(MBL2)*: межиндивидуальные уровни циркулирующих MBL могут отличаться до 10-кратных [83, 93]. Помимо генетической изменчивости, уровни MBL также могут значительно изменяться в течение жизни [89, 96].

Дефицит маннозосвязывающего лектина довольно распространен и встречается примерно у 8–10% людей и обычно определяется как ≤ 100 нг/мл в кровотоке [32, 39]. Влияние дефицита MBL на функционирование системы комплемента и состояние иммунитета более ощутимо, когда есть дополнительные сосуществующие иммунные дефекты [2], поскольку обычно большинство людей с дефицитом MBL практически здоровы [27]. Дефицит MBL часто имеет легкие клинические последствия [14]. Показано, что дефицит MBL связан с инфекциями верхних дыхательных путей у детей раннего возраста и с восприимчивостью к тяжелым инфекциям у пациентов, получающих химиотерапию [3, 39]. Явные клинические последствия MBL-дефицита можно наблюдать у пациентов с нейтропенией, после трансплантации органов и тканей, у новорожденных, особенно у недоношенных [26, 58]. В то же время значительное количество исследований показывает, что генетически детерминированный уровень MBL может модифицировать риск возникновения и клинические характеристики многих инфекционных заболеваний, причем такое влияние имеет множественный характер. Достаточно высокий уровень MBL является защитным фактором в отношении возникновения и тяжести инфекций, вызванных инкапсулированными бактериями (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* и *Neisseria meningitidis*), прежде всего у детей раннего возраста [31, 90]. В то же время нормальные/высокие уровни MBL могут повышать риск инфицирования и воспалительной реакции при инфекциях, вызванных некоторыми внутриклеточными возбудителями *(Mycobacterium tuberculosis, Leishmania, Mycoplasma pneumoniae, Chlamydophila pneumoniae, Legionella pneumophila, Coxiella burnetii)* [31, 98, 103]. Следовательно, носители некоторых MBL-дефицитных гаплотипов могут иметь определенное клиническое преимущество при этих внутриклеточных инфекциях.

Как было сказано выше, MBL может связываться с безмембранными структурами, в том числе вирусами. Пандемия COVID-19 дала рост исследований состояния иммунной системы человека и устойчивости к вирусу. Была доказана повышенная степень патологического тромбообразования, как осложнения тяжелой формы заболевания [63]. Показано, что у больных с тромбозами был повышен уровень MBL в плазме, и он коррелировал с уровнем D-димера — маркера коагулопатии. Активация системы комплемента посредством MBL также способствует массивной активации системы свертывания крови. Это изменение, наблюдаемое у многих пациентов с COVID-19, приводит к тромбозу, не поддающемуся стандартной фармакологической тромбопрофилактике. Исследование показывает, что система комплемента не только участвует в иммунной защите, но также может способствовать повышению склонности крови к свертыванию. Таким образом, именно связывание MBL с коронавирусом является основной причиной тромбозов при тяжелом течении [33].

Маннозосвязывающий лектин кодируется геном *MBL2*, расположенным на длинном плече хромосомы 10 (10q11.2-q21) [79]. На иммунологическую функцию лектинов влияют мутации в промоторном регионе и в кодирующей части их генов, модулируя транскрипционную активность и изменяя концентрацию белка. *MBL2* — высокополиморфный ген, показаны аллельные варианты, ответственные за большие вариации как уровней MBL, так и функциональной активности [12, 17, 19, 20, 98]. В настоящее время известно, что доминантные мутации в 1 экзоне гена *MBL2* приводят к снижению способности MBL к олигомеризации и, соответственно, к снижению его концентрации в плазме и подавлению функциональной активности, что в свою очередь ведет к повышенной восприим-

чивости к инфекциям. К таким последствиям приводят мутации в кодонах 52 (rs5030737; A/D), 54 (rs1800450; A/B) и 57 (rs1800451; A/C). Аллели, содержащие мутации в кодонах 52, 54 и 57 обозначаются, как D, B и C соответственно, в отличие от дикого аллеля (A). В связи с однотипными физиологическими последствиями мутации D, B и C в совокупности принято объединять в аллель «O», он дает начало дисфункциональным формам MBL, которые неспособны связываться со своими лигандами [57, 59, 86]. Индивиды O/O имеют почти неопределяемые уровни олигомеров MBL высокого порядка, тогда как индивиды A/O могут иметь пониженные уровни белка в плазме [60, 62]. На иммунологическую функцию MBL также влияют мутации в промоторном участке гена: диморфизмы в локусах rs11003125 (H/L) и rs7096206 (Y/X) модулируют транскрипционную активность, значительно влияя на концентрацию MBL в плазме крови [51]. Было установлено, что *HY*-диплотип ассоциирован с наиболее высокой плазменной концентрацией MBL, *LY*-диплотип — со средней концентрацией, а *LX* — с низкой [60]. Кроме того, был выявлен диморфизм в 5′-нетранслируемой части 1 экзона (rs7095891; *P/W*). Для оценки клинических последствий генетически детерминированных различий в экспрессии MBL было предложено выделять MBL-дефицитные (*YO/YO* или *XA/YO*), MBL-промежуточные (*YA/YO* или *XA/XA*) и MBL-высокоэкспрессирующие (*YA/YA* или *XA/YA*) диплотипы [37, 70]. В целом считается, что 20–25% всей человеческой популяции являются носителями MBL-дефицитных гаплотипов, а у 8–10% MBL в плазме крови отсутствует или крайне низок [25, 32, 60].

Фиколины (FCN)

Подобно MBL, фиколины представляют собой рецепторы распознавания, которые способны связываться с MASP и активировать систему комплемента через ЛП, играя важную роль в иммунной защите против клинически важных патогенов. Помимо активации комплемента, фиколины снижают риск инфицирования, стимулируя секрецию интерферона-гамма (IFNγ), IL-17, IL-6, фактора некроза опухоли-альфа (TNFα) макрофагами [75]. У человека описано три вида фиколинов: M-фиколин, кодирующийся геном *FCN1*, L-фиколин *(FCN2)* и H-фиколин *(FCN3)*. M-фиколин — исключительно тканевая молекула (экспрессируется в легких, моноцитах и селезенке), L-фиколин продуцируется в печени и циркулирует в крови, H-фиколин экспрессируется в печени и легких. Показано, что в легких в наибольшей степени продуцируется H-фиколин, а его комплемент-активирующая способность превышает таковую MBL. Структура фиколинов очень похожа на структуру MBL и также содержит домен, авидный к тем же углеводным компонентам бактерий, что и MBL. L-фиколин, в отличие от MBL, дополнительно может связывать некоторые компоненты грамположительных бактерий, в частности *S. pneumoniae* (в том числе капсульные формы) и *S. aureus*. Фиколин-2 обладает широкой специфичностью в отношении микроорганизмов, тем самым играя важную роль в первой линии врожденного иммунитета. Хотя клинические исследования фиколина-2 все еще находятся на начальной стадии, есть доказательства того, что дефицит фиколина-2 может повышать риск респираторных инфекций [52]. Фиколин-3 является наиболее распространенной молекулой распознавания ЛП и так как он высоко экспрессируется в тканях печени и легких, это указывает на его значимость как для активации ЛП, так и для защиты легких хозяина [4, 44]. Кроме того, недавно были получены первые свидетельства антимикробной активности фиколина-3 в отношении кишечно-комменсальных и условно-патогенных кишечных бактерий *Hafnia alvei* [67]. Примечательно, что фиколин-3 устойчив к коллагеназам (тогда как другие фиколины и коллагены нет), и это может отражаться на его антимикробной активности, в том числе в желудочно-кишечном тракте [44].

Описаны полиморфизмы промоторных и структурных регионов генов фиколинов. Ген *FCN1* расположен на хромосоме 9q34 и содержит девять экзонов. Среди нескольких SNP, описанных для гена *FCN1*, по крайней мере восемь связаны с уровнями фиколина-1, четыре из них расположены в промоторе и в первом экзоне [8]. Эти полиморфизмы частично ответственны за широкий диапазон (до 15 раз) межиндивидуальной изменчивости концентраций фиколина-1 в плазме (показатели могут различаться в 15 раз) [100]. Ген *FCN2* расположен на хромосоме 9q34.3 [65], три SNP в промоторной области и один в экзоне 8 связаны с вариациями уровней фиколина-2 в плазме: +6424 G>T, –986G>A, –602G>A и –4A>G и p.Ala258Ser, в то время как два других SNP в положениях –557 и –64, по-видимому, не влияют на экспрессию гена [42, 45]. Ген *FCN3* расположен на хромосоме 1p36.11 и высоко консервативен у человека. Было описано пять точечных мутаций, ответственных за замены аминокислот, все с частотами аллелей ниже 5%: p.Leu12Val, p.Leu117fs, p.Thr125Ala, p.Glu166Asp и p.Val287Ala [44]. Такой высокий консерватизм гена указывает на то, что фиколин-3 может выполнять решающую функцию в иммунном ответе. Действительно, недостаточность фиколина-3 встречается крайне редко [95].

Опубликованные результаты исследований связи концентрации и полиморфизмов генов фиколинов с какими-либо заболеваниями немногочисленны. Польские исследователи показали, что у детей с атопией с частыми респираторными инфекциями выявляются более низкие концентрации L-фиколина в плазме

крови [23]. Однако голландские исследователи не нашли какой-либо связи полиморфизмов генов *FCN2* и *FCN3* с рецидивирующими инфекциями у детей [77]. Описана связь полиморфизмов гена *FCN2* с предрасположенностью к таким заболеваниям, как висцеральный лейшманиоз, шистосомоз, гепатит В, туберкулез, синегнойная инфекция, а также преэклампсия, преждевременные роды, недоношенность и инфекции новорожденных [14, 69]. Среди полиморфизмов генов фиколинов наиболее изученными являются мутации rs17549193 и rs7851696 гена *FCN2*. В настоящее время предполагается, что для мутации rs17549193 наличие вариантного аллеля Т (генотипы СТ и ТТ) ассоциировано с низкой авидностью фиколина к патогенам. Показано, что этот структурный SNP ассоциирован с большей заболеваемостью висцеральным лейшманиозом и одновременно более высоким уровнем фиколина в плазме. Авторы предполагают, что высокие плазменные уровни L-фиколина обусловлены его низкой функциональной способностью связывать бактерию и, соответственно, меньшей способностью накапливаться в очаге воспаления [14].

Противоположная ситуация наблюдается с мутацией rs7851696, где с низкой авидностью ассоциирован нормальный (дикий) вариант гена *FCN2* (генотип GG). Показано, что у здоровых доноров в датской популяции уровень L-фиколина в плазме крови прогрессивно снижался при наличии мутации rs7851696 (генотипы GT и TT) [71]. Авторы предполагают, что наличие вариантного аллеля в этом случае связано с высокой тканевой активностью L-фиколина и, одновременно, его низкой концентрацией в плазме крови. Показано, что медианные уровни сыворотки дикого типа (GG), гетерозигот (GT) и гомозигот (TT) составляют 5100, 2200 и 900 нг/мл соответственно [53, 71]. Таким образом, гомозиготность не ведет к абсолютному дефициту фиколина-2, обычно ее называют недостаточностью фиколина-2 [52]. Еще ранее было показано, что генетический полиморфизм в 8 экзоне гена *FCN2*, приводящий к аминокислотной замене аланина на серин (p.A258S, мутация +6424G>T, rs7851696) повышает способность фиколина прикрепляться к углеводным компонентам бактерий, а тирозина на метионин (p.T236M, мутация +6359C>T, rs17549193) — снижает такую способность [42]. Таким образом, с точки зрения тканевой функциональности фиколина (авидности), для мутации +6359C>T не выгодны вариантные генотипы СТ и ТТ, а для мутации +6424G>T нормальный вариант генотипа — GG. Хотя эти генотипы и ассоциированы с высокими плазменными уровнями L-фиколина [23, 77], считается, что это свидетельствует об их низкой авидности и способности накапливаться в тканях.

Н-фиколин (фиколин-3) является наиболее мощным из известных активаторов ЛП комплемента, и его сывороточные концентрации значительно превышают концентрации L-фиколина и MBL. Его концентрация у взрослых колеблется в десять раз (6100–60 300 нг/мл) со средним значением 19 500 нг/мл [78]. Мутация rs28357092 (+1637delC) в экзоне 5 гена *FCN3* представляет собой мутацию со сдвигом рамки считывания, ведущую к усечению С-концевого конца белка фиколина-3, она приводит к снижению плазменных уровней Н-фиколина по типу ген-эффект зависимости: гомозиготы с такой делецией демонстрируют полное отсутствие плазменного уровня Н-фиколина, а у гетерозигот выявляются средние уровни протеина [68]. Гомозиготность по +1637delC встречается крайне редко (0,01–0,02), что свидетельствует о важнейших функциях фиколина-3: в литературе описано всего 6 случаев (все гомозиготы страдали тяжелыми инфекциями в раннем детском возрасте) [14]. Данные о популяционной частоте гетерозиготного носительства также крайне немногочисленны: в исландской когорте здоровых доноров было выявлено 15 гетерозигот из 483 обследованных (частота составила 1,5%).

Маннозосвязывающие лектин-ассоциированные сериновые протеазы (MASP)

Помимо MBL и фиколинов, одним из ключевых участников ЛП активации комплемента является семейство маннозосвязывающих лектин-ассоциированных сериновых протеаз (MASP). MBL-ассоциированные сериновые протеазы действуют как активаторы ЛП при связывании MBL, фиколинов и CL-K1 с углеводами или ацетильными группами на поверхности патогенов или измененных собственных тканей [76]. В семействе MASP были идентифицированы три протеазы (MASP-1, MASP-2, MASP-3) и два родственных неферментативных белка: MAp19 (sMAP) и MAp44 (MAP-1). MASP-1 и MASP-2 играют решающую роль в активации ЛП. Недавние исследования показали, что MASP-1 может автоматически активироваться и приводить к активации MASP-2 [30, 40]. MASP-2 также может автоматически активироваться, но в физиологическихусловияхименноMASP-1является основным активатором MASP-2 [54]. MASP-2 — это протеаза, которая расщепляет факторы комплемента С2 и С4, что приводит к активации каскада комплемента с образованием медиаторов воспаления (С3а и С5а), сборке комплекса мембранной атаки (МАС) и опсонизации [30, 40, 87]. С другой стороны, MASP-3, по-видимому, ослабляет активность ЛП из-за конкуренции за сайты связывания MASP на распознающих молекулах [29]. Кроме того, MASP-3 преимущественно образует комплекс с фиколином-3 и, как полагают, оказывает ингибирующее действие на активацию комплемента, опосредованную фиколином-3 [81]. Уровни MASP (MASP-1, MASP-2 и MASP-3) были показаны как предикторы

инфекции и длительной зависимости от интенсивной терапии у детей в критическом состоянии [46]. Наиболее изученной среди специфических ферментов, способных активировать как MBL, так и фиколины, является протеаза 2 типа — MASP-2. В результате анализа уровня MASP-2 в плазме у людей из различных этнических групп показано, что самым низким уровень был у африканцев, за которыми следовали китайцы из Гонконга, индейцы и датчане [92]. Уровни MASP-2 в сыворотке колеблются от 125 до 1150 нг/мл, в среднем составляя 416 нг/мл [78].

В эпоху пандемии COVID-19 новые исследования направлены на лечение осложнений заболевания, одно из которых, как говорилось выше — тромбоз. Показано, что MASP-2 связывает нуклеокапсидный белок коронавируса-2, ассоциированного с тяжелым острым респираторным синдромом (SARS-CoV-2), что приводит к чрезмерной активации комплемента и повреждению легких. Иными словами, продукты активации комплемента организуют провоспалительную среду, которая может иметь решающее значение для индукции и поддержания тяжелого воспалительного ответа на SARS-CoV-2, привлекая клетки иммунной системы к участкам инфекции и изменяя их состояние активации в сторону воспалительного фенотипа. Он предшествует патофизиологическим процессам, таким как цитокиновый шторм, прогрессирующее эндотелиальное повреждение, вызывающее микроангиопатию и дальнейшую активацию комплемента, и вызывает острый респираторный дистресс-синдром (ARDS) [5]. Итальянские ученые исследовали ингибирующее воздействие на активацию ЛП и антикоагулянтное действие Нарсоплимаба (Narsoplimab), человеческого моноклонального антитела гамма против MASP-2. В этом исследовании впервые был использован ингибитор ЛП для лечения COVID-19 и в сравнении с контрольными группами показана высокая степень выживаемости [74].

Полиморфный ген *MASP2* расположен на хромосоме 1p36.23-31, имеет 12 экзонов и кодирует два белка, MASP-2 и MAp19. Наиболее значимой мутацией *MASP2* является rs72550870 (p.D120G). Она приводит к замене аспарагиновой кислоты на глицин, вследствие чего белок теряет способность активировать комплемент из-за невозможности образовывать комплексы с лектинами, в частности с MBL и фиколинами. Врожденный дефицит MASP-2 обусловлен мутацией rs72550870 в гомозиготном состоянии (GG), характеризуется полным отсутствием сывороточной активности протеазы и приводит к нарушению связывания с MBL и с фиколинами [84, 94]. Всего тринадцать случаев гомозиготного носительства GG rs72550870 было описано в литературе с момента выявления первого случая, зарегистрированного в 2003 г. [84]. Клинические проявления снижения/отсутствия активности MASP-2 могут варьировать от полного здоровья до тяжелых инфекций и предрасположенности к онкологическим заболеваниям [14]. После того как появились данные о трех здоровых взрослых с дефицитом MASP-2, гомозиготных по GG в *MASP2* [36, 73], клиническая пенетрантность этого дефицита стала сомнительной. Таким образом, ассоциация дефицита MASP-2 (GG rs72550870) с клиническими проявлениями в настоящее время является неопределенной. Вероятно, что в ЛП участвуют неидентифицированные молекулы и функции, которые могут объяснить, почему дефицит MASP-2 относительно часто встречается у практически здоровых людей [14].

Было высказано предположение, что ЛП активации системы комплемента необязателен или даже избыточен (например, при тяжелом течении COVID) для формирования иммунного ответа у большинства здоровых лиц, а его дефицит клинически значим только в определенных ситуациях, например, у недоношенных новорожденных. С другой стороны, показана ассоциация полиморфизмов *MASP2* с восприимчивостью к лепре [18], малярии [43], болезни Шагаса [17], бактериальным инфекциям [28] и гепатиту С [97]. Уровни MASP-2 также были связаны с рядом системных заболеваний, включая шизофрению [66], септический шок [24], острый лимфобластный лейкоз, неходжкинскую лимфому, опухоли центральной нервной системы [35], колоректальный рак [101, 102]. Эти исследования доказывают возрастающее важное биологическое значение MASPs в патогенезе заболеваний человека.

Этнические особенности распределения полиморфизмов генов — компонентов лектинового пути активации комплемента

Распределение частот гаплотипов гена MBL имеет крайне выраженные популяционные различия [17, 60]. Так, частота встречаемости гаплотипа *HYPA*, ассоциированного с высокой концентрацией MBL, варьирует от 6–8% в африканских популяциях — Мозамбик, Кения [60, 61], до 64–81% в северных коренных популяциях — североамериканские индейцы и инуиты [13, 38, 70]. Европеоиды в этой градации занимают промежуточное положение с 27–30% частотой гаплотипа *HYPA* [11, 80, 83]. В связи с выраженным неравновесным сцеплением все описанные выше мутации могут комбинироваться в ограниченное число гаплотипов из 64 возможных (*HYPA, LXPA, LYQA, LYPA, HYPD, LYPB, LYPD* и *LYQC*) [60, 85]. Важно понимать, что оценка риска связи генотипов и гаплотипов с восприимчивостью к заболеваниям в значительной мере может зависеть от этнического и возрастного состава исследованных популяций [10, 22].

Результаты исследований, проведенных в НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск [91], показывают, что частота высокопродуцирующего гаплотипа *HYPA* гена *MBL2* составляет 35,4% у русских новорожденных Восточной Сибири, что соответствует частотам европейских популяций (Голландии — 27%, Дании — 30%, Чехии — 33%), а также европеоидов Бразилии (28–34%). В то же время у новорожденных Таймырского Долгано-Ненецкого района Красноярского края частота гаплотипа *HYPA* была статистически значимо выше, чем у русских, и составила 64% для ненцев и 56% для долган-нганасан, что близко к значениям частот распространения выявленных для эскимосов (81%) и североамериканских индейцев (64%). Данные о частотах генотипов и гаплотипов гена *MBL2* среди коренных народностей российских Арктических территорий в указанном исследовании были получены впервые.

Минорный аллель *FCN2* rs17549193 (+6359C>T) связан со значительным снижением связывающей способности L-фиколина с углеводными компонентами клеточных стенок бактерий, в то время как минорный аллель rs7851696 (+6424G>T) был связан с повышенной связывающей способностью [45]. Было показано, что у здоровых голландских доноров уровни L-фиколина в плазме прогрессивно снижались в зависимости от наличия мутантного аллеля rs7851696. Это свидетельствует о том, что данный вариантный аллель связан с высокой тканевой активностью L-фиколина и, одновременно, с его низкой концентрацией в плазме. Не было обнаружено статистически значимой связи между концентрацией L-фиколина в сыворотке и полиморфизмом rs17549193 в этой голландской когорте [71]. В то же время некоторые исследования показали, что высокие уровни L-фиколина были связаны с вариантным аллелем rs17549193 [26].

В аборигенных популяциях как ненцев, так и долган-нганасан Таймырского Долгано-Ненецкого района Красноярского края обнаружено снижение распространенности генотипа полиморфизма *FCN2* rs7851696, связанного с низкой связывающей способностью L-фиколина к углеводам, по сравнению с европеоидами Восточной Сибири. Результаты этого исследования показали, что ненецкая популяция обладает рядом важных особенностей по сравнению с долганами-нганасанами: более низкая распространенность аллеля T для полиморфизма rs17549193 и более высокая распространенность аллеля T для полиморфизма rs7851696 *FCN2* [82]. Мы полагаем, что этот генотип является генетическим маркером высокой функциональной способности L-фиколина в ненецкой популяции. Иными словами, была показана большая частота распространенности генотипов, ассоциированных с высокой активностью L-фиколина, в Арктических популяциях ненцев и долган-нганасан, в сравнении с европеоидами Восточной Сибири [82]. Таким образом, популяции коренных народов Арктики генетически характеризуются большей активностью как минимум двух различающихся компонентов ЛП активации комплемента — MBL и L-фиколина.

Как указывалось выше, данные о популяционной частоте полиморфных вариантов rs28357092 гена *FCN3* немногочисленны: ориентировочная частота гетерозиготного носительства среди европеоидов может составить 1.5% [14]. Значительно больше данных о популяционных частотах полиморфизмов rs72550870 гена *MASP2*. В датской когорте частота редкого аллеля G составила 3,9% [95], такая же частота выявлена в исландской выборке взрослых доноров [14]. Интересно, что аллель G вообще не был выявлен в популяциях китайцев Гонконга, африканских замбийцев и коренных американцев Бразилии [95].

Группа ученых из Исландии опубликовали данные результатов исследования частоты распределения вариантов *FCN2* + 6424, *FCN3* + 1637delC и rs72550870 MASP2 у MBL-дефицитных здоровых лиц, предполагая, что отсутствие MBL может быть компенсировано другими паттерн-распознающими белками. Было высказано предположение, что варианты *FCN2* + 6424 и *FCN3* + 1637delC, которые вызывают зависимое от гена снижение уровней фиколина-2 и фиколина-3 соответственно, могут быть редкими у лиц с дефицитом MBL из-за процесса компенсации внутри ЛП [14]. Авторы продемонстрировали, что существует благоприятный баланс между концентрацией MBL и фиколина-2 в сыворотке для хозяина, который поддерживается на протяжении всей эволюции, что контролируется генетическими вариантами.

Данные о частотах распределения полиморфизмов генов *MBL2, FCN2, FCN3* и *MASP2* в российских популяциях и патогенетической роли компонентов ЛП компонента крайне немногочисленны. Российские ученые [1] изучили распространенность одного полиморфизма +230G/A гена *MBL* у жителей Санкт-Петербурга: гомозиготы по мутантному аллелю A составили 30 (25%) и 5 (4%) соответственно. Авторы делают вывод, что «учитывая частую встречаемость мутации гена MBL, являющейся причиной первичного иммунодефицита в популяции Санкт-Петербурга, необходим скрининг пациентов с рецидивирующими инфекциями». Ряд исследований российских авторов был посвящен клинико-генетическим сопоставлениям мутаций в гене *MBL* с риском сердечно-сосудистых заболеваний, преэклампсии, особенностями клинической картины муковисцидоза и прогрессирования ВИЧ-инфекции. Ранее было высказано предположение, что изолированные Арктические популяции Таймырского Долгано-Ненецкого района Красноярского края исторически позже столк-

нулись с инфекциями и, вследствие этого, сохранили сформированную на ранних этапах эволюции человека высокую активность ЛП активации комплемента [90].

Согласно анализу доступных нам литературных данных, в настоящее время популяционные частоты мутаций, ассоциированных с врожденными дефицитами протеинов ЛП активации системы комплемента в российских популяциях и в популяциях коренных народностей, не изучены. Актуальность получения таких данных для российских арктических популяций значительно возрастает, учитывая накапливающиеся доказательства важной роли компонентов ЛП активации комплемента (в том числе MBL, MASP2) в отношении вирусных инфекций, в том числе вызываемых новыми коронавирусными инфекциями — SARS и COVID-19 [47, 64].

Результаты вышеупомянутых исследований лежат в основе гипотезы, предполагающей, что эволюция человека продвигалась в направлении накопления генотипов с низкой активностью ЛП активации комплемента, вследствие широкого распространения некоторых внутриклеточных инфекций, таких как туберкулез и лепра, при которых низкая активность MBL и L-фиколина может оказывать протективный эффект [17, 32, 98]. Мы полагаем, что происходит селективное популяционное давление в отношении ЛП активации комплемента, как общего патофизиологического механизма, опосредованного генами лектинов, и, вероятно, ассоциированного с предрасположенностью к некоторым инфекциям.

В заключение необходимо отметить, что к настоящему времени остается значительное число нерешенных вопросов в отношении истинной роли протеинов ЛП активации комплемента в патогенезе конкретных заболеваний. Во многом такая ситуация складывается из-за патогенетического дуализма ЛП активации комплемента. С одной стороны, его высокая функциональная активность способствует элиминации многих бактериальных и вирусных патогенов, что является необходимым компонентом противоинфекционной защиты, особенно в раннем детском возрасте. С другой стороны, избыточная активность протеинов ЛП может способствовать инфекциям, вызванными внутриклеточными бактериями, а также являться предрасполагающим фактором более агрессивного течения некоторых вирусных инфекций, например SARS-CoV-2. Авторы надеются, что представленная систематизация современных данных о функции, полиморфизме генов и участии в патогенезе заболеваний протеинов ЛП активации комплемента вызовет интерес у широкого круга иммунологов, генетиков и клиницистов и будет способствовать дальнейшему прогрессу в этой области исследований.

Список литературы/References

1. Романов А.О., Беляева Т.В., Красильщикова И.В. Частота встречаемости полиморфизма +230G/A гена MBL у жителей Санкт-Петербурга // Medline.Ru. 2006. Т. 7, № 1. С. 372–377. [Romanov A.O., Belyaeva T.V., Krasilshchikova I.V. Frequency of occurrence of +230G/A polymorphism of the MBL gene in residents of St. Petersburg. *Medline.Ru, 2006, vol. 7, no. 1, pp. 372–377. (In Russ.)*]
2. Aittoniemi J., Baer M., Soppi E., Vesikari T., Miettinen A. Mannan-binding lectin deficiency and concomitant immunodefects. *Arch. Dis. Child., 1998, vol. 78, pp. 245–248. doi: 10.1136/adc.78.3.245*
3. Aittoniemi J., Miettinen A., Laippala P., Isolauri E., Viikari J., Ruuska T., Soppi E. Age-dependent variation in the serum concentration of mannan-binding protein. *Acta Paediatr., 1996, vol. 85, pp. 906–909. doi: 10.1111/j.1651-2227.1996.tb14182.x.*
4. Akaiwa M., Yae Y., Sugimoto R., Suzuki S.O., Iwaki T., Izuhara K., Hamasaki N. Hakata antigen, a new member of the ficolin/opsonin p35 family, is a novel human lectin secreted into bronchus/alveolus and bile. *J. Histochem. Cytochem., 1999, vol. 47, pp. 777–786. doi: 10.1177/002215549904700607*
5. Ali Y.M., Ferrari M., Lynch N.J., Yaseen S., Dudler T., Gragerov S., Demopulos G., Heeney J.L., Schwaeble W.J. Lectin pathway mediates complement activation by SARS-CoV-2 proteins. *Front. Immunol., 2021, vol. 12: 714511. doi: 10.3389/fimmu.2021.714511*
6. Ali Y.M., Lynch N.J., Haleem K.S., Fujita T., EndoY., Hansen S., Holmskov U., Takahashi K., Stahl G.L., Dudler T., Girija U.V., Wallis R., Kadioglu A., Stover C.M., Andrew P.W., Schwaeble W.J. The lectin pathway of complement activation is a critical component of the innate immune response to pneumococcal infection. *PLoS Pathog., 2012, vol. 8, no. 7: e1002793. doi: 10.1371/journal.ppat.1002793*
7. Ambrosio A.R., De Messias-Reason I.J. Leishmania (Viannia) braziliensis: interaction of mannose-binding lectin with surface glycoconjugates and complement activation. An antibody-independent defence mechanism. *Parasite Immunol., 2005, vol. 27, pp. 333–340. doi: 10.1111/j.1365-3024.2005.00782.x*
8. Ammitzbøll C.G., Kjær T.R., Steffensen R., Stengaard-Pedersen K., Nielsen H.J., Thiel S., Bøgsted M., Jensenius J.C. Non-synonymous polymorphisms in the FCN1 gene determine ligand-binding ability and serum levels of M-ficolin. *PLoS One, 2012, vol. 7, no. 11: e50585. doi: 10.1371/journal.pone.0050585*
9. Arai T., Tabona P., Summerfield J.A. Human mannose-binding protein gene is regulated by interleukins, dexamethasone and heat shock. *Q. J. Med., 1993, vol. 86, pp. 575–582. doi: 10.1093/oxfordjournals.qjmed.a068848*
10. Areeshi M.Y., Mandal R.K., Akhter N., Dar S.A., Jawed A., Wahid M., Mahto H., Panda A.K., Lohani M., Haque S. A meta-analysis of MBL2 polymorphisms and tuberculosis risk. *Sci. Rep., 2016, vol. 6: 35728. doi: 10.1038/srep35728*
11. Bernig T., Breunis W., Brouwer N., Hutchinson A., Welch R., Roos D., Kuijpers T., Chanock S. An analysis of genetic variation across the MBL2 locus in Dutch Caucasians indicates that 3′ haplotypes could modify circulating levels of mannose-binding lectin. *Hum. Genet., 2005, vol. 118, no. 3–4, pp. 404–415 doi: 10.1007/s00439-005-0053-5*

12. Bernig T., Taylor J.G., Foster C.B., Staats B., Yeager M., Chanock S.J. Sequence analysis of the mannose-binding lectin (MBL2) gene reveals a high degree of het-erozygosity with evidence of selection. *Genes Immun., 2004, vol. 5, pp. 461–476. doi: 10.1038/sj.gene.6364116*
13. Best L.G., Davidson M., North K.E., Maccluer J.W., Zhang Y., Lee E.T., Howard B.V., Decroo S., Ferrell R.E. Prospective analysis of mannose-binding lectin genotypes and coronary artery disease in American Indians: the strong heart study. *Circulation, 2004, vol. 109, no. 4, pp. 471–475. doi: 10.1161/01.CIR.0000109757.95461.10*
14. Bjarnadottir H., Arnardottir M., Ludviksson B.R. Frequency and distribution of FCN2 and FCN3 functional variants among MBL2 genotypes. *Immunogenetics, 2016, vol. 68, no. 5, pp. 315–325. doi: 10.1007/s00251-016-0903-4*
15. Blom A.M., Villoutreix B.O., Dahlbäck B. Complement inhibitor C4b-binding protein-friend or foe in the innate immune system? *Mol. Immunol., 2004, vol. 40, pp. 1333–1346. doi: 10.1016/j.molimm.2003.12.002*
16. Bohlson S.S., Fraser D.A., Tenner A.J. Complement proteins C1q and MBL are pattern recognition molecules that signal immediate and long-term protective immune functions. *Mol. Immunol., 2007, vol. 44, pp. 33–43. doi: 10.1016/j.molimm.2006.06.021*
17. Boldt A.B., Culpi L., Tsuneto L.T., De Souza I.R., Kun J.F., Petzl-Erler M.L. Diversity of the MBL2 gene in various Brazilian populations and the case of selection at the mannose-binding lectin locus. *Hum. Immunol., 2006, vol. 67, no. 9, pp. 722–734. doi: 10.1016/j.humimm.2006.05.009*
18. Boldt A.B., Goeldner I., Stahlke E.R., Thiel S., Jensenius J.C., de Messias-Reason I.J. Leprosy association with low MASP-2 levels generated by MASP2 haplotypes and polymorphisms flanking MAp19 exon 5. *PLoS One, 2013, vol. 8, no. 7: e69054. doi: 10.1371/journal.pone.0069054*
19. Boldt A.B., Luty A., Grobusch M.P., Dietz K., Dzeing A., Kombila M., Kremsner P.G., Kun J.F. Association of a new mannose-binding lectin variant with severe malaria in Gabonese children. *Genes Immun., 2006, vol. 7, pp. 393–400. doi: 10.1038/sj.gene.6364312*
20. Boldt A.B., Messias-Reason I.J., Meyer D., Schrago C.G., Lang F., Lell B., Dietz K., Kremsner P.G., Petzl-Erler M.L., Kun J.F. Phylogenetic nomenclature and evolution of mannose-binding lectin (MBL2) haplotypes. *BMC Genet., 2010, vol. 11: 38. doi: 10.1186/1471-2156-11-38*
21. Brodszki N., Frazer-Abel A., Grumach A.S., Kirschfink M., Litzman J., Perez E., Seppänen M.R.J., Sullivan K.E., Jolles S. European Society for Immunodeficiencies (ESID) and European Reference Network on Rare Primary Immunodeficiency, Autoinflammatory and Autoimmune Diseases (ERN RITA) Complement Guideline: Deficiencies, Diagnosis, and Management. *J. Clin. Immunol., 2020, vol. 40, no. 4, pp. 576–591. doi: 10.1007/s10875-020-00754-1*
22. Cao Y., Wang X., Cao Z., Wu C., Wu D., Cheng X. Genetic polymorphisms of MBL2 and tuberculosis susceptibility: a meta-analysis of 22 case-control studies. *Arch. Med. Sci., 2018, vol. 14, no. 6, pp. 1212–1232. doi: 10.5114/aoms.2017.65319*
23. Cedzynski M., Nuytinck L., Atkinson A.P., St Swierzko A., Zeman K., SzemraJ. J., Szala A., Turner M.L., Kilpatrick D.C. Extremes of L-ficolin concentration in children with recurrent infections are associated with single nucleotide polymorphisms in the FCN2 gene. *Clin. Exp. Immunol., 2007, vol. 150, pp. 99–104. doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03471.x*
24. Chalmers J.D., Mchugh B.J., Doherty C., Smith M.P., Govan J.R., Kilpatrick D.C., Hill A.T. Mannose-binding lectin deciency and disease severity in non-cystic fibrosis bronchiectasis: a prospective study. *Lancet Respir. Med., 2013, vol. 1, no. 3, pp. 224–232. doi: 10.1016/S2213-2600(13)70001-8*
25. Charchaflieh J., Wei J., Labaze G., Hou Y.J., Babarsh B., Stutz H., Lee H., Worah M., Zhang M. The role of complement system in septic shock. *Clin. Dev. Immunol., 2012, vol. 2012: 407324. doi: 10.1155/2012/407324*
26. Czerewaty M., Tarnowski M., Safranow K., Domanski L., Pawlik A. Mannose binding lectin 2 gene polymorphisms in patients after renal transplantation with acute graft rejection. *Transpl. Immunol., 2019, vol. 54, pp. 29–37. doi: 10.1016/j.trim.2019.01.004*
27. Dahl M., Tybjaerg-Hansen A., Schnohr P., Nordestgaard B.G. A population-based study of morbidity and mortality in mannose-binding lectin deficiency. *J. Exp. Med., 2004, vol. 199, pp. 1391–1399. doi: 10.1084/jem.20040111*
28. De Rooij B.J.F., van Hoek B., ten Hove W.R., Roos A., Bouwman L.H., Schaapherder A.F., Porte R.G., Daha M.R., van der Reijden J.J., Coenraad M.J., Ringers J., Baranski A.G., Hepkema B.G., Hommes D.W., Verspaget H.W. Lectin complement pathway gene profile of donor and recipient determine the risk of bacterial infections after orthotopic liver transplantation. *Hepatology, 2010, vol. 52, pp. 1100–1110. doi: 10.1002/hep.23782*
29. Degn S.E., Jensen L., Gál P., Dobó J., Holmvad S.H., Jensenius J.C., Thiel S. Biological variations of MASP-3 and MAp44, two splice products of the MASP1 gene involved in regulation of the complement system. *J. Immunol. Methods, 2010, vol. 361, pp. 37–50. doi: 10.1016/j.jim.2010.07.006*
30. Degn S.E., Jensen L., Hansen A.G., Duman D., Tekin M., Jensenius J.C., Thiel S. Mannan-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 is crucial for lectin pathway activation in human serum, whereas neither MASP-1 nor MASP-3 is required for alternative pathway function. *J. Immunol., 2012, vol. 189, pp. 3957–3969. doi: 10.4049/jimmunol.1201736*
31. Eisen D.P., Dean M.M., Boermeester M.A., Fidler K.J., Gordon A.C., Kronborg G., Kun J.F.J., Lau Y.L., Payeras A., Valdimarsson H., Brett S.J., Ip W.K.E., Mila J., Peters M.J., Saevarsdottir S., van Till J.W.O., Hinds C.J., McBryde E.S. Low serum mannose-binding lectin level increases the risk of death due to pneumococcal infection. *Clin. Infect. Dis., 2008, vol. 47, no. 4, pp. 510–516. doi: 10.1086/590006*
32. Eisen D.P., Ostho M. If there is an evolutionary selection pressure for the high frequency of MBL2 polymorphisms, what is it? *Clin. Exp. Immunol., 2014, vol. 176, no. 2, pp. 165–171. doi: 10.1111/cei.12241*
33. Eriksson O., Hultström M., Persson B., Lipcsey M., Ekdahl K.N., Nilsson B., Frithiof R. Mannose-binding lectin is associated with thrombosis and coagulopathy in critically ill COVID-19 patients. *Thromb. Haemost., 2020, vol. 120, no. 12, pp. 1720–1724. doi: 10.1055/s-0040-1715835*
34. Ezekowitz R.A., Day L.E., Herman G.A. A human mannose-binding protein is an acute-phase reactant that shares sequence homology with other vertebrate lectins. *J. ExpMed., 1988, vol. 167, pp. 1034–1046. doi: 10.1084/jem.167.3.1034*
35. Fisch U.P., Zehnder A., Hirt A., Niggli F.K., Simon A., Ozsahin H., Schlapbach L.J., Ammann R.A. Mannan-binding lectin (MBL) and MBL-associated serine protease-2 in children with cancer. *Swiss Med. Wkly, 2011, vol. 141: w13191. doi: 10.4414/smw.2011.13191*

36. Garcia-Laorden M.I., Sole-Violan J., Rodriguez de Castro F., Aspa J., Briones M.L., Garcia-Saavedra A., Rajas O., Blanquer J., Caballero-Hidalgo A., Marcos-Ramos J.A., Hernandez-Lopez J., Rodriguez-Gallego C. Mannose-binding lectin and mannose-binding lectin-associated serine protease 2 in susceptibility, severity, and outcome of pneumonia in adults. *J. Allergy Clin. Immunol., 2008, vol. 122, no. 2, pp. 368–374. doi: 10.1016/j.jaci.2008.05.037*
37. Garred P., Honore C., Ma Y.J., Munthe-Fog L., Hummelshøj T. MBL2, FCN1, FCN2 and FCN3 — the genes behind the initiation of the lectin pathway of complement. *Mol. Immunol., 2009, vol. 46, no. 14, pp. 2737–2744. doi: 10.1016/j.molimm.2009.05.005*
38. Hegele R.A., Busch C.P., Young T.K., Connelly P.W., Cao H. Mannose-binding lectin gene variation and cardiovascular disease in Canadian inuit. *Clin. Chem., 1999, vol. 45, no. 8 (pt 1), pp. 1283–1285. doi: 10.1093/clinchem/45.8.1283*
39. Heitzeneder S., Seidel M., Förster-Waldl.E., Heitger A. Mannan-binding lectin deficiency — good news, bad news, doesn't matter? *Clin. Immunol., 2012, vol. 143, pp. 22–38. doi: 10.1016/j.clim.2011.11.002*
40. Héja D., Harmat V., Fodor K., Wilmanns M., Dobó J., Kékesi K.A. Monospecific inhibitors show that both mannan-binding lectin-associated serine protease-1 (MASP-1) and -2 are essential for lectin pathway activation and reveal structural plasticity of MASP-2. *J. Biol. Chem., 2012, vol. 287, pp. 20290–20300. doi: 10.1074/jbc.M112.354332*
41. Héja D., Kocsis A., Dobó J., Szilágyi K., Szász R., Závodszky P., Pál G., Gál P. Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2012, vol. 109, pp. 10498–10503. doi: 10.1073/pnas.1202588109*
42. Herpers B.L., Immink M.M., de Jong B.A., van Velzen-Blad H., de Jongh B.M., van Hannen E.J. Coding and non-coding polymorphisms in the lectin pathway activator L-ficolin gene in 188 Dutch blood bank donors. *Mol. Immunol., 2006, vol. 43, pp. 851–855. doi: 10.1016/j.molimm.2005.06.035*
43. Holmberg V., Onkamo P., Lahtela E., Lahermo P., Bedu-Addo G., Mockenhaupt F.P., Meri S. Mutations of complement lectin pathway genes MBL2 and MASP2 associated with placental malaria. *Malar J., 2012, vol. 11: 61. doi: 10.1186/1475-2875-11-61*
44. Hummelshøj T., Fog L.M., Madsen H.O., Sim R.B., Garred P. Comparative study of the human ficolins reveals unique features of ficolin-3 (Hakata antigen). *Mol. Immunol., 2008, vol. 45, pp. 1623–1632. doi: 10.1016/j.molimm.2007.10.006*
45. Hummelshøj T., Munthe-Fog L., Madsen H.O., Fujita T., Matsushita M., Garred P. Polymorphisms in the FCN2 gene determine serum variation and function of ficolin-2. *Hum. Mol. Genet., 2005, vol. 14, pp. 1651–1658. doi: 10.1093/hmg/ddi173*
46. Ingels C., Vanhorebeek I., Steffensen R., Derese I., Jensen L., Wouters P.J., Hermans G., Thiel S., den Berghe G.V. Lectin pathway of complement activation and relation with clinical complications in critically ill children. *Pediatr. Res., 2014, vol. 75, pp. 99–108. doi: 10.1038/pr.2013.180*
47. Ip W.K.E., Chan K.H., Law H.K.W., Tso G.H.W., Kong E.K.P., Wong W.H.S., To Y.F., Yung R.W.H., Chow E.Y., Au K.L., Chan E.Y.T., Lim W., Jensenius J.C., Turner M.W., Peiris J.S.M., Lau Y.L. Mannose-binding lectin in severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *J. Infect. Dis., 2005, vol. 191, no. 10, pp. 1697–1704. doi: 10.1086/429631*
48. Jack D., Turner M. Antimicrobial activities of mannose-binding lectin. *Biochem. Soc. Trans., 2003, vol. 31, pp. 753–757. doi: 10.1042/bst0310753*
49. Jensen P.H., Laursen I., Matthiesen F., Højrup P. Post translational modifications in human plasma MBL and human recombinant MBL. *Biochim. Biophys. Acta., 2007, vol. 1774, pp. 335–344. doi: 10.1016/j.bbapap.2006.12.008*
50. Kang H.J., Lee S.-M., Lee H.-H., Kim J.Y., Lee B.-C., Yum J.-S., Moon H.M., Lee B.L. Mannose-binding lectin without the aid of its associated serine proteases alters lipopolysaccharide-mediated cytokine/chemokine secretion from human endothelial cells. *Immunology, 2007, vol. 122, pp. 335–342. doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02644.x*
51. Kilpatrick D. Mannan-binding lectin and its role in innate immunity. *Transfus. Med., 2003, vol. 12, no. 6, pp. 335–352. doi: 10.1046/j.1365-3148.2002.00408.x*
52. Kilpatrick D.C., Chalmers J.D. Human L-ficolin (ficolin-2) and its clinical significance. *J. Biomed. Biotechnol., 2012, vol. 2012. doi: 10.1155/2012/138797*
53. Kilpatrick D.C., St Swierzko A., Matsushita M., Domzalska-Popadiuk I., Borkowska-Klos M., Szczapa J., Cedzynski M. The relationship between FCN2 genotypes and serum ficolin-2 (L-ficolin) protein concentrations from a large cohort of neonates. *Hum. Immunol., 2013, vol. 74, pp. 867–871. doi: 10.1016/j.humimm.2013.04.011*
54. Kjaer T.R., Thiel S., Andersen G.R. Toward a structure-based comprehension of the lectin pathway of complement. *Mol. Immunol., 2013, vol. 56, pp. 413–422. doi: 10.1016/j.molimm.2013.05.220*
55. Klabunde J., Berger J., Jensenius J.C., Klinkert M.Q., Zelck U.E., Kremsner P.G., Kun J.F. Schistosoma mansoni: adhesion of mannan-binding lectin to surface glycoproteins of cercariae and adult worms. *Exp. Parasitol., 2000, vol. 95, pp. 231–239. doi: 10.1006/expr.2000.4539*
56. Klabunde J., Uhlemann A.-C., Tebo A.E., Kimmel J., Schwarz R.T., Kremsner P.G., Kun J.F. Recognition of plasmodium falciparum proteins by mannan-binding lectin, a component of the human innate immune system. *Parasitol. Res., 2002, vol. 88, pp. 113–117. doi: 10.1007/s00436-001-0518-y*
57. Lipscombe R.J., Sumiya M., Summerfield J.A., Turner M.W. Distinct physico-chemical characteristics of human mannose binding protein expressed by individuals of differing genotype. *Immunology, 1995, vol. 85, pp. 660–667.*
58. Luo J., Xu F., Lu G.-J., Lin H.-C., Feng Z.-C. Low mannose-binding lectin (MBL) levels and MBL genetic polymorphisms associated with the risk of neonatal sepsis: an updated meta-analysis. *Early Hum. Dev., 2014, vol. 90, no. 10, pp. 557–564. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2014.07.007*
59. Madsen H.O., Garred P., Kurtzhals J.A., Lamm L.U., Ryder L.P., Thiel S., Svejgaard A. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. *Immunogenetics, 1994, vol. 40, pp. 37–44. doi: 10.1007/BF00163962*
60. Madsen H.O., Garred P., Thiel S., Kurtzhals J.A., Lamm L.U., Ryder L.P., Svejgaard A. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *J. Immunol., 1995, vol. 155, no. 6, pp. 3013–3020.*
61. Madsen H.O., Satz M.L., Hogh B., Svejgaard A., Garred P. Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from southeast Africa and South America. *J. Immunol., 1998, vol. 161, no. 6, pp. 3169–3175.*

62. Madsen H.O., Videm V., Svejgaard A., Svennevig J.L., Garred P. Association of mannose-binding lectin deficiency with severe atherosclerosis. *Lancet, 1998, vol. 352, pp. 959–960. doi: 10.1016/S0140-6736(05)61513-9*
63. Manolis A.S., Manolis T.A., Manolis A.A., Papatheou D., Melita H. COVID-19 Infection: Viral Macro- and micro-vascular coagulopathy and thromboembolism/prophylactic and therapeutic management. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther., 2021, vol. 26, no. 1, pp. 12–24. doi: 10.1177/1074248420958973*
64. Matricardi P.M., Negro R.W.D., Nisin R. The first, holistic immunological model of COVID-19: implications for prevention, diagnosis, and public health measures. *Pediatr. Allergy Immunol., 2020, vol. 31, no. 5, pp. 454–470. doi: 10.1111/pai.13271*
65. Matsushita M., Endo Y., Taira S., Sato Y., Fujita T., Ichikawa N., Nakata M., Mizuochi T. A novel human serum lectin with collagen and fibrinogen-like domains that functions as an opsonin. *J. Biol. Chem., 1996, vol. 271, pp. 2448–2454. doi: 10.1074/jbc.271.5.2448*
66. Mayilyan K.R., Arnold J.N., Presanis J.S., Soghoyan A.F., Sim R.B. Increased complement classical and mannan-binding lectin pathway activities in schizo-phrenia. *Neurosci. Lett., 2006, vol. 404, pp. 336–341. doi: 10.1016/j.neulet.2006.06.051*
67. Michalski M., St Swierzko A., Lukasiewicz J., Man-Kupisinska A., Karwaciak I., Przygodzka P., Cedzynski M. Ficolin-3 activity towards the opportunistic patho-gen, Hafnia alvei. *Immunobiology, 2015, vol. 220, pp. 117–123. doi: 10.1016/j.imbio.2014.08.012*
68. Michalski M., Szala A., St Swierzko A., Lukasiewicz J., Maciejewska A., Kilpatrick D.C., Matsushita M., Domzalska-Popadiuk I., Borkowska-Klos M., Sokolowska A., Szczapa J., Lugowski C., Cedzynski M. H-ficolin (ficolin-3) concentrations and FCN3 gene polymorphism in neonates. *Immunobiology, 2011, vol. 217, pp. 730–737. doi: 10.1016/j.imbio.2011.12.004*
69. Mishra A., Antony J.S., Sundaravadivel P., Tong H.V., Meyer C.G., Jalli R.D., Velavan T.P., ThangaraJ. K. Association of ficolin-2 serum levels and FCN2 genetic variants with Indian visceral leishmaniasis. *PLoS One, 2015, vol. 10, no. 5: e0125940. doi: 10.1371/journal.pone.0125940*
70. Monsey L., Best L.G., Zhu J., Decroo S., Anderson M.Z. The association of mannose binding lectin genotype and immune response to Chlamydia pneumoniae: the strong heart study. *PLoS One, 2019, vol. 14, no. 1: e0210640. doi: 10.1371/journal.pone.0210640*
71. Munthe-Fog L., Hummelshøj T., Hansen B.E., Koch C., Madsen H.O., Skjodt K., Garred P. The impact of FCN2 polymorphisms and haplotypes on the ficolin-2 serum levels. Scand. *J. Immunol., 2007, vol. 65, pp. 383–392. doi: 10.1111/j.1365-3083.2007.01915.x*
72. Nauta A.J., Castellano G., Xu W., Woltman A.M., Borrias M.C., Daha M.R., Kooten C., Roos A. Opsonization with C1q and mannose-binding lectin targets apoptotic cells to dendritic cells. *J. Immunol., 2004, vol. 173, pp. 3044–3050. doi: 10.4049/jimmunol.173.5.3044*
73. Notarangelo L., Casanova J.-L., Fischer A., Puck J., Rosen F., Seger R., Geha R. Primary immunodeficiency diseases: an update. *J. Allergy Clin. Immunol., 2004, vol. 114, no. 3, pp. 677–687. doi: 10.1016/j.jaci.2004.06.044*
74. Rambaldi A., Gritti G., Micò M.C., Frigeni M., Borleri G., Salvi A., Landi F., Pavoni C., Sonzogni A., Gianatti A., Binda F., Fagiuoli S., Marco F.D., Lorini L., Remuzzi G., Whitaker S., Demopulos G. Endothelial injury and thrombotic microangiopathy in COVID-19: Treatment with the lectin-pathway inhibitor narsoplimab. *Immunobiology, 2020, vol. 225, no. 6: 152001. doi: 10.1016/j.imbio.2020.152001*
75. Ren Y., Ding Q., Zhang X. Ficolins and infectious diseases. *Virol. Sin., 2014, vol. 29, pp. 25–32. doi: 10.1007/s12250-014-3421-2*
76. Ricklin D., Hajishengallis G., Yang K., Lambris J.D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat. Immunol., 2010, vol. 11, pp. 785–797. doi: 10.1038/ni.1923*
77. Ruskamp J.M., Hoekstra M.O., Postma D.S., Kerkhof M., Bottema R.W., Koppelman G.H., Rovers M.M., Wijga A.H., de Jongste J.C., Brunekreef B., Sanders E.A.M. Exploring the role of polymorphisms in ficolin genes in respiratory tract infections in children. *Clin. Exp. Immunol., 2009, vol. 155, no. 3, pp. 433–440. doi: 10.1111/j.1365-2249.2008.03844.x*
78. Sallenbach S., Thiel S., Aebi C., Otth M., Bigler S., Jensenius J.C., Schlapbach L.J., Ammann R.A. Serum concentrations of lectin-pathway components in healthy neonates, children and adults: mannan-binding lectin (MBL), M-, L-, and H-ficolin, and MBL-associated serine protease-2 (MASP-2). *Pediatr. Allergy Immunol., 2011, vol. 22, pp. 424–430. doi: 10.1111/j.1399-3038.2010.01104.x*
79. Sastry K., Herman G.A., Day L., Deignan E., Bruns G., Morton C.C., Ezekowitz R.A.B. The human mannose-binding protein gene. Exon structure reveals its evolutionary relationship to a human pulmonary surfactant gene and localization to chromosome 10. *J. Exp. Med., 1989, vol. 170, pp. 1175–1189. doi: 10.1084/jem.170.4.1175*
80. Skalnikova H., Freiberger T., Chumchalova J., Grombirikova H., Sediva A. Cost-effective genotyping of human MBL2 gene mutations using multiplex PCR. *J. Immunol. Methods, 2004, vol. 295, no. 1–2, pp. 139–147. doi: 10.1016/j.jim.2004.10.007*
81. Skjoedt M.-O., Hummelshøj T., Palarasah Y., Honore C., Koch C., Skjodt K., Garred P. A novel mannose-binding lectin/ficolin-associated protein is highly expressed in heart and skeletal muscle tissues and inhibits complement activation. *J. Biol. Chem., 2010, vol. 285, pp. 8234–8243. doi: 10.1074/jbc.M109.065805*
82. Smolnikova M.V., Freidin M.B., Tereshchenko S.Y. The prevalence of the variants of the L-ficolin gene (FCN2) in the arctic populations of East Siberia. *Immunogenetics, 2017, vol. 69, no. 6, pp. 409–413. doi: 10.1007/s00251-017-0984-8*
83. Steffensen R., Thiel S., Varming K., Jersild C., Jensenius J.C. Detection of structural gene mutations and promoter polymorphisms in the mannan-binding lectin (MBL) gene by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *J. Immunol. Methods, 2000, vol. 241, pp. 33–42. doi: 10.1016/s0022-1759(00)00198-8*
84. Stengaard-Pedersen K., Thiel S., Gadjeva M., Møller-Kristensen M., Sørensen R., Jensen L.T., Sjøholm A.G., Fugger L., Jensenius J.C. Inherited deficiency of mannan-binding lectin-associated serine protease 2. *N. Engl. J. Med., 2003, vol. 349, no. 6, pp. 554–560. doi: 10.1056/NEJMoa022836*
85. Sullivan K.E., Wooten C., Goldman D., Petri M. Mannose-binding protein genetic polymorphisms in black patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol., 1996, vol. 39, no. 12, pp. 2046–2051. doi: 10.1002/art.1780391214*
86. Sumiya M., Super M., Tabona P., Levinsky R.J., Arai T., Turner M.W., Summerfield J.A. Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. *Lancet, 1991, vol. 337, pp. 1569–1570. doi: 10.1016/0140-6736(91)93263-9*

87. Takahashi M., Iwaki D., Kanno K., Ishida Y., Xiong J., Matsushita M., Endo Y., Miura S., Ishii N., Sugamura K., Fujita T. Mannose-binding lectin (MBL)-associated serine protease (MASP)-1 contributes to activation of the lectin complement pathway. *J. Immunol., 2008, vol. 180, pp. 6132–6138. doi: 10.4049/jimmunol.180.9.6132*
88. Tenner A.J., Robinson S.L., Ezekowitz R.A. Mannose binding protein (MBP) enhances mononuclear phagocyte function via a receptor that contains the 126,000 M(r) component of the C1q receptor. *Immunity, 1995, vol. 3, pp. 485–493. doi: 10.1016/1074-7613(95)90177-9*
89. Terai I., Kobayashi K. Perinatal changes in serum mannose-binding protein (MBP) levels. *Immunol. Lett., 1993, vol. 38, pp. 185–187. doi: 10.1016/0165-2478(93)90004-1*
90. Tereshchenko S.Y., Kasparov E.V., Smolnikova M.V., Kuvshinova E.V. Mannose-binding lectin deciency in respiratory diseases. *Rus. Pulmonol., 2016, vol. 26, no. 6, pp. 748–752. doi: 10.1159/000228159*
91. Tereshchenko S.Y., Smolnikova M.V., Freidin M.B. Mannose-binding lectin gene polymorphisms in the East Siberia and Russian Arctic populations. *Immunogenetics, 2020, vol. 72, no. 6–7, pp. 347–354. doi: 10.1007/s00251-020-01175-5*
92. Thiel S. Complement activating soluble pattern recognition molecules with collagen-like regions, mannan-binding lectin, ficolins and associated proteins. *Mol. Immunol., 2007, vol. 44, pp. 3875–3888. doi: 10.1016/j.molimm.2007.06.005*
93. Thiel S., Holmskov U., Hviid L., Laursen S.B., Jensenius J.C. The concentration of the C-type lectin, mannan-binding protein, in human plasma increases during an acute phase response. *Clin. Exp. Immunol., 1992, vol. 90, pp. 31–35. doi: 10.1111/j.1365-2249.1992.tb05827.x*
94. Thiel S., Kolev M., Degn S., Steffensen R., Hansen A.G., Ruseva M., Jensenius J.C. Polymorphisms in mannan-binding lectin (MBL)-associated serine protease 2 affect stability, binding to MBL, and enzymatic activity. *J. Immunol., 2009, vol. 182, pp. 2939–2947. doi: 10.4049/jimmunol.0802053*
95. Thiel S., Steffensen R., Christensen I.J., Ip W.K., Lau Y.L., Reason I.J., Eiberg H., Gadjeva M., Ruseva M., Jensenius J.C. Deficiency of mannan-binding lectin associated serine protease-2 due to missense polymorphisms. *Genes Immun., 2007, vol. 8, pp. 154–163. doi: 10.1038/sj.gene.6364373*
96. Trégoat V., Montagne P., Béné M.-C., Faure G. Changes in the mannan binding lectin (MBL) concentration in human milk during lactation. *J. Clin. Lab. Anal., 2002, vol. 16, pp. 304–307. doi: 10.1002/jcla.10055*
97. Tulio S., Faucz F.R., Werneck R.I., Olandoski M., Alexandre R.B., Boldt A.B., Pedroso M.L., de Messias-Reason I.J. MASP2 gene polymorphismis associated with susceptibility to hepatitis C virus infection. *Hum. Immunol., 2011, vol. 72, pp. 912–915. doi: 10.1016/j.humimm.2011.06.016*
98. Verdu P., Barreiro L.B., Patin E., Gessain A., Cassar O., Kidd J.R., Kidd K.K., Behar D.M., Froment A., Heyer E., Sica L., Casanova J.L., Abel L., Quintana-Murci L. Evolutionary insights into the high worldwide prevalence of MBL2 deciency alleles. *Hum. Mol. Genet., 2006, vol. 15, no. 17, pp. 2650–2658. doi: 10.1093/hmg/ddl193*
99. Walport M.J. Complement. First of two parts. *N. Engl. J. Med., 2001, vol. 344, pp. 1058–1066. doi: 10.1056/NEJM200104053441406*
100. Wittenborn T., Thiel S., Jensen L., Nielsen H.J., Jensenius J.C. Characteristics and biological variations of M-ficolin, a pattern recognition molecule, in plasma. *J. Innate Immun., 2010, vol. 2, pp. 167–180. doi: 10.1159/000218324*
101. Ytting H., Christensen I.J., Thiel S., Jensenius J.C., Nielsen H.J. Pre- and postoperative levels in serum of mannan-binding lectin associated serine protease-2 — a prognostic marker in colorectal cancer. *Hum. Immunol., 2008, vol. 69, pp. 414–420. doi: 10.1016/j.humimm.2008.05.005*
102. Ytting H., Christensen I.J., Thiel S., Jensenius J.C., Nielsen H.J. Serum mannan-binding lectin-associated serine protease-2 levels in colorectal cancer: relation to recurrence and mortality. *Clin. Cancer Res., 2005, vol. 11, pp. 1441–1446. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1272*
103. Zhang J.X., Gong W.P., Zhu D.L., An H.R., Yang Y.R., Liang Y., Wang J., Tang J., Zhao W.G., Wu X.Q. Mannose-binding lectin 2 gene polymorphisms and their association with tuberculosis in a Chinese population. *Infect. Dis. Poverty, 2020, vol. 9, no. 1: 46. doi: 10.1186/s40249-020-00664-9*

Авторы:

Смольникова М.В., к.б.н., руководитель группы молекулярно-генетических исследований, ведущий научный сотрудник НИИ медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН, г. Красноярск, Россия;

Терещенко С.Ю., д.м.н., профессор, зав. клиническим отделением соматического и психического здоровья детей НИИ медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН, г. Красноярск, Россия.

Authors:

Smolnikova M.V., PhD (Biology), Head of the Molecular Genetic Research Group, Leading Researcher, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Tereshchenko S.Yu., PhD, MD (Medicine), Head of the Clinical Department of Somatic and Mental Health of Children, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 28.07.2021
Принята к печати 14.01.2022

Received 28.07.2021
Accepted 14.01.2022

Инфекция и иммунитет
2022, Т. 12, № 2, с. 222–238

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2022, vol. 12, no. 2, pp. 222–238

ТРЕТИЙ ЭТИЧЕСКИЙ КОММЕНТАРИЙ К COVID-19 (два года спустя) — ВАКЦИНАЦИЯ, СОЛИДАРНОСТЬ И ДОВЕРИЕ

О.И. Кубарь[1], Г.Л. Микиртичан[2], Е.Ю. Владимирова[3], Т.Г. Таги-заде[4], Ф.М. Мамедова[4], У.К. Гаджиева[4], С.А. Давтян[5], Ф.М. Мавсисян[5], У.М. Тилекеева[6], Р.К. Грамма[7], Ф.Ю. Насырова[8], Ф.Х. Тишкова[9], З.М. Мухамедова[10], Ф.С. Атамурадова[11]

[1] *ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия*
[2] *ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия*
[3] *Межпарламентская ассамблея государств — участников СНГ, Санкт-Петербург, Россия*
[4] *Азербайджанский медицинский университет, Баку, Азербайджан*
[5] *Ереванский государственный медицинский университет им. М. Гераци, Ереван, Армения*
[6] *Кыргызская государственная медицинская академия им. И.К. Ахунбаева, Бишкек, Кыргызстан*
[7] *Государственный медицинский и фармацевтический университет им. Николая Тестемицану, Кишенев, Молдова*
[8] *Институт ботаники, физиологии и генетики растений Таджикской национальной академии наук, Душанбе, Таджикистан*
[9] *Таджикский НИИ профилактической медицины, Душанбе, Таджикистан*
[10] *Ташкентский государственный стоматологический институт, Ташкент, Узбекистан*
[11] *Ташкентская медицинская академия, Ташкент, Узбекистан*

Резюме. Системный мониторинг этического содержания и событий пандемии COVID-19, осуществляемый нами на протяжении последних двух лет, служит развитию мультипрофессиональной дискуссии на одной из самых актуальных публицистических площадок — страницах журнала «Инфекция и иммунитет». Две предыдущие статьи последовательно представляли нравственный контекст исторически сложившихся регуляторных и эпидемиологических парадигм и анализ готовности или неготовности следовать им в реальных условиях эпидемического кризиса. Современный нравственный срез пандемии, характеризующийся состоянием глобальной утраты ценностей социального единства, доверия и солидарности, практически не оставляет сомнения в доминирующей роли этики как критерия разрешения конфликта интересов. Точкой наивысшего морального напряжения стала вакцинопрофилактика на всех уровнях продвижения в действенный ресурс сдерживания пандемии COVID-19. Понимание персональной и профессиональной ответственности, основанной на многолетнем научном исследовании проблемы этики вакцинации, воплощенной в книгах «Этика инфекционной патологии» (2014) и «Этика вакцинации (критерий научного и гуманитарного прорыва» (2018), определило нашу заинтересованность в написании настоящей статьи. В представляемом вниманию читателей третьем этическом комментарии поставлены две идеологически связанные задачи. Во-первых, рассмотреть этически выверенный канон вакцинопрофилактики на конкретном примере пандемии COVID-19. Во-вторых, раздвинуть рамки обсуждения роли этики путем подключения опыта проведения вакцинации в контексте регионального кластера: государствах — участниках СНГ. Такая возможность появилась благодаря долгосрочному сотрудничеству по созданию системы этической экспертизы в рамках проекта ВОЗ «Форум

Адрес для переписки:
Кубарь Ольга Иосифовна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 (812) 233-21-56. E-mail: okubar@list.ru

Contacts:
Olga I. Kubar
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Тел.: +7 (812) 233-21-56. E-mail: okubar@list.ru

Для цитирования:
Кубарь О.И., Микиртичан Г.Л., Владимирова Е.Ю., Таги-заде Т.Г., Мамедова Ф.М., Гаджиева У.К., Давтян С.А., Мавсисян Ф.М., Тилекеева У.М., Грамма Р.К., Насырова Ф.Ю., Тишкова Ф.Х., Мухамедова З.М., Атамурадова Ф.С. Третий этический комментарий к COVID-19 (два года спустя) — вакцинация, солидарность и доверие // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 2. С. 222–238. doi: 10.15789/2220-7619-THC-1875

Citation:
Kubar O.I., Mikirtichan G.L., Vladimirova E.Yu., Taghi-zade T.G., Mamedova F.M., Gadzhieva U.K., Davtyan S.A., Mavsisyan F.M., Tilekeeva U.M., Gramma R.K., Nasyrova F.Yu., Tishkova F.H., Muhamedova Z.M., Atamuradova F.S. The third ethical commentary to COVID-19 (two years later) — vaccination, solidarity, and trust // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 2, pp. 222–238. doi: 10.15789/2220-7619-THC-1875

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-THC-1875

комитетов по этике государств — участников СНГ (ФКЭСНГ)» и практики разработки модельных нормативных документов в сфере социальной политики и прав человека МПА СНГ. Перспективная направленность данной работы состоит в необходимости новаторского подхода к выработке управленческих решений путем укрупнения междисциплинарного диапазона и расширения зон ответственности социального и биоэтического смысла при защите общественного здоровья в чрезвычайных ситуациях.

Ключевые слова: *биоэтика, вакцинопрофилактика, социальный конфликт, COVID-19, пандемия.*

THE THIRD ETHICAL COMMENTARY TO COVID-19 (two years later) — VACCINATION, SOLIDARITY, AND TRUST

Kubar O.I.[a], Mikirtichan G.L.[b], Vladimirova E.Yu.[c], Taghi-zade T.G.[d], Mamedova F.M.[d], Gadzhieva U.K.[d], Davtyan S.A.[e], Mavsisyan F.M.[e], Tilekeeva U.M.[f], Gramma R.K.[g], Nasyrova F.Yu.[h], Tishkova F.H.[i], Muhamedova Z.M.[j], Atamuradova F.S.[k]

[a] *St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation*
[b] *St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation*
[c] *CIS Interparliamentary Assembly, St. Petersburg, Russian Federation*
[d] *Azerbaijan Medical University, Baku, Azerbaijan*
[e] *Yerevan State Medical University named after M. Heratsi, Yerevan, Armenia*
[f] *Kyrgyz State Medical Academy named after I.K. Akhunbaev, Bishkek, Kyrgyzstan*
[g] *Nicolae Testemiţanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Moldova*
[h] *Institute of Botany, Plant Physiology and Genetics, Tajikistan National Academy of Sciences, Dushanbe, Tajikistan*
[i] *Tajik Research Institute of Preventive Medicine, Dushanbe, Tajikistan*
[j] *Tashkent State Dental Institute, Tashkent, Uzbekistan*
[k] *Tashkent Medical Academy, Tashkent, Uzbekistan*

Abstract. The systematic monitoring of ethical contents and events related to COVID-19 pandemic, carried out over the last two years, serves to develop a multi-professional discussion on one of the most relevant platforms — Russian Journal Infection and Immunity. Two previous articles consistently presented the moral context of historically established regulatory and epidemiological paradigms and the analysis of readiness/unwillingness to follow them in the real-life conditions during the epidemic crisis. The contemporary moral cross-section of the pandemic, characterized by the state of global loss of values of social unity, trust and solidarity leaves virtually no doubt about the dominant role of ethics as a criterion for resolving conflicts of interest. The point of the peak moral tension was vaccine prevention at all levels of its introduction into an effective resource for containing COVID-19. According to the authors' personal and professional responsibility, based on long-term scientific research of vaccination-related ethics, embodied in the books Ethics of Infectious Pathology (2014) and Ethics of Vaccination (Criterion of Scientific and Humanitarian Breakthrough (2018), account for our interest in writing this paper. In the Third Ethical Commentary presented to the readers the two ideologically related tasks have been set. First, to consider the ethically verified canon of vaccine prevention specifically exemplified by COVID-19 pandemic. Second, to expand the scope in the discussion of the ethics role by connecting the vaccination in the context of a regional cluster, namely the CIS member states. This opportunity took place owing the long-term cooperation to create ethical evaluation system within the framework of the WHO project Forum of Ethics Committees in the Commonwealth of Independent States (FECCIS) and the practice of developing model laws in the field of social policy and human rights of the IPA CIS. The perspective focus of this work is the need for an innovative approach to develop management decisions by enlarging the interdisciplinary range and expanding the areas of responsibility of social and bioethical meaning while protecting public health in epidemic crisis.

Key words: *bioethics, preventive vaccination, social conflict, COVID-19, pandemic.*

Архитектура настоящего исследования, прежде всего, подчеркивает его неразрывную логистическую связь с серией всех предшествующих авторских работ по этике вакцинации и этической составляющей пандемии COVID-19 [29, 31, 32, 70, 91]. Значимость данного тезиса заключается в констатации неизменной приверженности классической медицинской науке в области вакцинологии и универсальной концепции биомедицинской этики.

Представленные материалы и доводы являют собой логическое продолжение ответственного мультидисциплинарного размышления, направленного на познание гуманитарных вызовов самой пандемии и реакции на нее. В статье акцент сделан на элементах этического регулирования в нормативной сфере и анализе применения этического стандарта в практике вакцинации при COVID-19 в ряде государств — участников СНГ, что призвано служить единой стратегии всей серии работ по выявлению этических конфликтов, их влиянию на успех противоэпидемических мероприятий и формированию политики гуманитарных действий в будущем.

Канон этики вакцинации и его интерпретация в условиях пандемии COVID-19

Универсальность данного раздела статьи определяется двумя непреложными истинами, положенными в основу всей концепции изложения. Первая заключается в констатации исторически достоверного научного факта, что вакцинопрофилактика служит реальным подтверждением успеха внедрения научных достижений в практику мировой системы здравоохранения. Вторая, имеющая философские корни, осознанно признает за вакцинопрофилактикой четкую связь и необходимость разрешения различного уровня конфликта интересов, острота которого диалектически нарастает параллельно с прогрессом биотехнологий и социально-экономической поляризацией общества. Применительно ко второму тезису необходимо добавить специфику природы конфликта интересов, который на международном уровне прослеживается в плане солидарности субъектов разработки и использования вакцин, а на национальном уровне — в плане доступности вакцин и доверия общества [70, 71].

Очевидная острота проблемы определила тот факт, что концепция этики вакцинации находится в поле постоянного внимания ведущих, действующих в данной области международных организаций: ЮНЕСКО, ЮНЭЙДС, ВОЗ, СДС и других [32, 75, 79, 81, 82, 87, 98, 99, 101]. Этическая составляющая вакцинации введена в законотворческий оборот и терминологическую палитру всех профильных нормативных документов РФ и других стран СНГ, широко представлена в научных публикациях и СМИ, а также является предметом постоянных дискуссий между гражданским и научным сообществом, светской властью и религиозными конфессиями [70].

Система правил по обеспечению должного уважения достоинства, соблюдения прав человека и основных свобод параллельно с гарантией достижения научной объективности исследования вакцин изложена нами в специальном разделе актуального «Руководства для членов комитетов по этике», созданного в рамках инициативного проекта Совета по этики РФ в 2021 г. [30].

Строгий регламентирующий контекст и понимание идеологии рекомендуемых решений не возможен без принятия ряда как общих, так и персональных (частных) критериев преодоления конфликтов, возникающих в процессе создания вакцин. К списку ведущих общих критериев могут быть отнесены следующие: разрешение конфликта интересов индивидуума и общества, обеспечение уважения автономии личности и право выбора, доступность и справедливость распределения благ/риска/ущерба, учет культурного/религиозного разнообразия и различной уязвимости индивидуумов/групп/сообществ, недопущение дискриминации и стигматизации, социальная ответственность и солидарность.

В качестве частных критериев преодоления этических конфликтов следует выделить честность, осторожность и требовательность при оценке научных данных и принятии решений, альтруизм, личную порядочность, открытость, плюрализм, независимость, персональную ответственность.

Ранее в специальных работах по созданию этического алгоритма эрадикации вакциноуправляемых инфекций мы детально прорабатывали действенность каждого из перечисленных выше критериев [90]. В данном исследовании приоритетной задачей стало выявить и обозначить этические критерии, учет и соблюдение которых значимо для каждого конкретного этапа и всей этической целостности концепции вакцинации в пандемию COVID-19. В связи с этим проведен детальный анализ данных в сфере этических дилемм и вызовов, соответственно возникающих на разных стадиях разработки вакцин против COVID-19, таких как оценка бремени инфекции, формирование идеи создания вакцины, испытание, регистрация, производство, продвижение, применение, контроль за эффективностью и безопасностью.

Диапазон эпидемиологического, клинического, социального, экономического и политического кризиса пандемии COVID-19 однозначно отвечает этическому требованию соответствия нуждам и приоритетам здравоохранения вовлеченных в пандемию стран и необходимости сосредоточения усилий на обеспечении профилактики распространения инфекции [54, 78, 80, 88]. В этом смысле глобальная доминанта по созданию вакцин как реальной возможности управления пандемией и ее сдерживания, оправдана с эпидемической, социальной и этической точек зрения.

Однако даже при всей логической безупречности самой идеи следует отметить неполноту соответствия нескольким ключевым параметрам, которые априори не могли быть ясны на момент начала разработки вакцин. Прежде всего, к ним относится дефицит научной базы по экологической эпидемиологии COVID-19 как зооантропоноза и лимит понимания механизма иммунологической защиты [17, 33, 55, 94]. Что касается научно-технологического подхода, то при создании специфических вакцин были использованы стратегии, выработанные в отношении других исследовательских практик, что исключало наличие адекватного экспериментального ресурса [5]. Беспрецедентной также можно назвать ситуацию невиданного

по масштабу идеологического, академического, финансового и политического давления.

По факту приведенных выше аргументов есть все основания признать, что в процессе этической экспертизы проектов разработки вакцин существовала необходимость рассмотрения недостаточных экспериментальных научных данных и имело место преодоление широкого профиля конфликта интересов нравственного, профессионального, финансового и административного толка. В то же время социальная составляющая этического признания была необычайно велика в силу глобального общественного запроса на сдерживание пандемии и морального восприятия обществом ожиданий, связанных с разработкой вакцин.

Процесс испытания и регистрации вакцин против COVID-19 также потребовал адаптационных экспресс-мер, что было сопряжено с новыми этическими вызовами. Одними из наиболее критичных в плане этической приемлемости стали исследования вакцин с контролируемым заражением инфекционным агентом здоровых добровольцев — Human Challenge Studies (HCS) [86, 89, 92, 96, 97]. В рамках данного обзора важно привести результаты нашего анализа этического аспекта таких подходов [30].

Исследования с заражением инфекционным агентом могут быть в принципе возможны и целесообразны только в случае, когда испытание на модели животных не адекватно отражает состояние у человека или принципиально не воспроизводимо.

Даже если подобные испытания оптимизируют разработку вакцин, они недопустимы с точки зрения этики в тех случаях, когда в результате моделирования процесса у добровольцев происходит развитие заболевания с длительным или неопределенным латентным периодом и/или потенциально высокой частотой неблагоприятных последствий, и не существует методов их контроля.

Условием этического одобрения, помимо отмеченных выше, является наличие соответствующей нормативно-правовой базы и специальной инфраструктуры для проведения исследования с гарантией безопасности для добровольцев, персонала и окружающей среды. Введение в регуляторный ряд подобных исследований в период пандемии и их признание ВОЗ было обосновано целью найти скорейший и объективный ответ на целый ряд неясных вопросов относительно управления новой инфекционной патологией. К первостепенным по важности могут быть отнесены задачи изучения патогенеза заболевания и трансмиссивности вируса, выбор лучшего штамма среди потенциальных кандидатов на вакцину с целью его включения в последующие фазы испытания при реальной минимизации риска, средств и времени [102, 103]. Позитивный момент нацеленности на скорость получения объективных результатов одновременно сочетался с необходимостью морального альтруизма участвующих в исследовании лиц и высокой степенью профессиональной и персональной ответственности исследователей.

Представляя диапазон специфических моментов этической экспертизы проектов исследования вакцин против COVID-19 и последующего одобрения для регистрации препарата, следует обозначить ряд полемических доводов. Однозначно необходимы данные позитивного влияния вакцин на общие показатели эпидемической ситуации и национальные/международные стандарты эпидемиологического надзора. Достижение такой цели возможно лишь при условии гарантии персональной справедливости (равного доступа к преимуществам/благам) и общественной справедливости путем финансовых, производственных, интеллектуальных инвестиций в инфраструктуры стран с более низким уровнем ресурсов, что, в свою очередь, означает приверженность солидарности и сотрудничеству [85].

Конкретными мерами должны были стать усилия по оперативному приведению к новым условиям нормативного регламента, создание системы показателей экспресс-оценки результатов, консультирование и поиск баланса мнений среди представителей общественных групп, вовлеченных в исследование, согласование с государственными регуляторными и профильными структурами, фармацевтическим бизнесом и СМИ [65].

Столь же этически компромиссным является этап продвижения вакцин против COVID-19 и их применения в медицинской практике [27, 70]. Достаточно остановиться на базовых условиях этики продвижения вакцин, к которым относятся открытость и достоверность информации о препарате и данных клинических исследований [68]. Во-первых, следование принципу достоверности в целом невозможно из-за лимита доказательной базы данных по всем вакцинным препаратам против COVID-19 в настоящий момент, и, тем более, в связи с отсутствием отдаленных наблюдений. Во-вторых, принцип открытости приобрел искаженный и двусмысленный характер в результате непрофессионального и агрессивного вмешательства в трактовку научных данных, что обусловило общественное смущение и недоверие. Поток противоречивой информации касается всех ключевых вопросов грамотной политики вакцинации. Он затронул безопасное производство и контроль качества вакцин, эпидемиологический баланс, иммунологическую эквивалентность, соответствие показаний/противопоказаний, честность в конку-

ренции, регистрацию нежелательных явлений, уважение культурных/религиозных различий, благотворительность и солидарность во всех сферах взаимодействия научно-медицинского сообщества, фармацевтических компаний и гражданского общества. Особого внимания заслуживает псевдотрактовка концепции прав и свобод, исключившая из зоны смыслов объективный характер состояния «двойной лояльности» и конституционно закрепленную социальную ответственность государства на ограничение прав/свобод индивидуума для защиты прав и законных интересов других лиц (общества) и обеспечения безопасности (в том числе эпидемиологической) [70].

Особое значение с точки зрения духовной практики имеет тенденция, сложившаяся в сфере отношения религиозных конфессий к вакцинации против COVID-19. Ранее проведенный нами анализ показал, что ни в одной из основных религий мира не существует абсолютного запрета на вакцинацию, напротив, она рассматривается как фактор спасения жизни [77]. В связи с этим выдвигаемые как бы религиозные доводы антивакцинаторов отражают лишь неосведомленность об истинном богословском аспекте отношения основных религий к иммунизации.

Однако пандемия COVID-19, в силу указанных выше конфликтных этических ситуаций, обострила глубинные религиозные смущения, связанные с вакцинацией и ее восприятием верующими.

В христианстве в целом и, в частности, в православии, например в Русской православной церкви (РПЦ), главное неприятие связано с тем, что при создании отдельных вакцин, в том числе некоторых вакцин от COVID-19, используются клеточные культуры, выращенные из эмбриональных человеческих клеток, полученных вследствие аборта, пусть даже совершенного полвека тому назад и более. Позиция православных врачей и философов по этому вопросу была высказана еще в 2009 г. и нашла отражение в заявлении Церковно-общественного совета по биомедицинской этике Московского патриархата [58]. Как отмечено в «Основах социальной концепции», церковь считает недопустимым «изъятие и использование тканей и органов человеческих зародышей, абортированных на разных стадиях развития, для попыток лечения различных заболеваний» (XII.7) [50]. Проблема использования абортивного материала при производстве вакцин COVID-19 стала предметом направленного диалога отдела по взаимоотношениям церкви с обществом Священного Синода РПЦ и разработчиков вакцин, где констатирована необходимость изыскания возможности применения технологий, исключающих использование упомянутых клеточных культур [58].

В целом вопросу этики вакцинации и отношения к ней в контексте православного вероучения были посвящены многие дискуссии, в ходе которых почеркнуто, что РПЦ последовательно придерживается принципов защиты свободы выбора человека «в использовании или неиспользовании новых и быстро развивающихся технологий, в том числе в сфере медицины» [1, 56].

Святейший Патриарх Московский и всея Руси Кирилл в своем высказывании о вакцинации отметил, что совершенно недопустимым является злоупотребление пастырской властью: «...грехом лжи следует назвать как намеренное недостаточное и недостоверное информирование людей об эффектах вакцин, так и распространение непроверенных слухов и мифов относительно последствий вакцинации» [22].

Говоря о других христианских конфессиях, таких как католичество, тоже следует указать, что есть некоторые религиозные лидеры, которые призывают верующих отказаться от вакцинации против COVID-19, также основываясь на «неэтичности» препарата, где используются клетки человеческого эмбриона. Однако Папа Римский Франциск назвал «этическим долгом» каждого привиться от коронавируса, и ранее он сам одним из первых получил первую дозу вакцины Pfizer-BioNTech [52].

Приверженцы ислама — религии, представляющей собой вторую после христианства по численности верующих в РФ и доминирующую в ряде стран СНГ — также тщательно обсуждают проблемы вакцинопрофилактики. Отвечая на вопрос о главном сомнении среди мусульман по халяльности вакцин, на основании научных консультаций по составу, в частности, вакцины Спутник V Советом улемов было подготовлено заключение, в котором отмечено: «вакцина — халяль, кому не противопоказана вакцинация — должны вакцинироваться». Духовное собрание мусульман России 18 июля 2021 г. опубликовало фетву (богословское заключение), где высказало неодобрение по поводу беспричинных отказов верующих от вакцинации от COVID-19 [28].

Муфтий Равиль Гайнутдин, председатель Духовного управления мусульман РФ, председатель Совета муфтиев России, высказался в этом отношении так: «Мы, со своей стороны, через наших имамов призываем верующих, чтобы они прививались, чтобы они защитили себя и своих близких. Защита жизни и здоровья является обязанностью мусульманина» [64].

Актуальные примеры всех отмеченных выше этических вызовов продемонстрированы на опыте разных стран СНГ. При этом следует отметить, что в целом имеет место недостаток в четкости понимания этики на всех этапах создания вакцин и, в этой связи, манипулирование

этическими принципами без должного уважения к их целостности в процессе вакцинации. Именно эти обстоятельства породили нравственный кризис недоверия, разобщенности и, как результат, отказ от идеологии глобальной солидарности и солидарности наций в критических условиях пандемии [16, 19, 23, 83].

Этический баланс стратегии вакцинации против COVID-19 на глобальном, региональном и национальном уровнях

Действенный и правдивый отклик на разрыв нравственных связей сотрудничества в стратегии вакцинации против COVID-19 прозвучал от имени наиболее авторитетной международной гуманитарной организации — ЮНЕСКО. В открытом обращении к государствам-членам и всему мировому сообществу в феврале 2021 г. ЮНЕСКО призвала рассматривать вакцины «как глобальное общественное достояние» и обеспечить их эффективную поставку и доступность на справедливой основе во всех странах и для всех уязвимых слоев населения [98]. При этом необходимо учитывать взаимосвязанность достижения справедливости вакцинации и наличия/восстановления доверия к науке и органам здравоохранения.

Проведенный нами анализ основ гуманитарного реагирования в кризисных ситуациях позволяет новаторски адаптировать этическую концепцию вакцинации против COVID-19, способную стабилизировать баланс доверия и справедливости. В практику принятия решений следует внести следование этическим принципам необходимости, соразмерности, различия, правомерности, ограничения, гуманности, слежения, предупреждения, коррекции и ответственности за правонарушение, содержание которых будет представлено ниже по ходу рассмотрения опыта вакцинации в разных странах СНГ [75, 82, 87].

Иллюстрацией своевременности предложенного алгоритма этических решений служит законотворческая деятельность Межпарламентской ассамблеи СНГ. Убедительным аргументом в пользу обоснованного применения этических принципов необходимости, соразмерности и правомерности стали объединенные инициативные действия, нашедшие отражение в совместном заявлении Совета МПА СНГ и Европейского бюро (ЕБ) ВОЗ «О роли парламентов в противодействии COVID-19» [45].

Принципы различия, ограничения и гуманности стали ориентирами в проведении гуманитарной политики доступа к вакцинации наиболее уязвимых с социально-политической точки зрения слоев населения, к котором могут быть отнесены трудовые мигранты. Понимание актуальности проблемы трудовой миграции в регионе стран СНГ и признание эпидемиологического и социально-нравственного значения охвата вакцинацией этого контингента обосновало объединенное участие Совета МПА СНГ, Регионального отделения Международной организации по миграции и ЕБ ВОЗ в подготовке совместного заявления «О мерах законодательного обеспечения трудовой миграции в период пандемии» [42].

Особого внимания заслуживают актуальные меры взаимодействия в области санитарно-эпидемиологического контроля и возможность их реализации с сохранением арсенала универсальных этических стандартов, что и послужило основанием для представления панорамы этико-эпидемиологических наблюдений в отдельных странах содружества.

Характеристика этико-эпидемиологических данных в ряде стран СНГ

Исторически сложившаяся система эпидемиологического надзора, характерная для всех государств постсоветского пространства, имела очевидный позитивный ресурс и продемонстрировала в период пандемии COVID-19 главные этически оправданные свойства — солидарность и сотрудничество. Данные управленческие качества нашли отражение в сфере разработки, внедрения вакцин и проведения вакцинопрофилактики.

В плане совместных действий по борьбе с эпидемиями по инициативе РФ были задействованы ресурсы четырех региональных объединений: ЕАЭС, ШОС, Восточноазиатского саммита и СНГ. Представление в данной статье площадки СНГ обусловлено, в первую очередь, многолетним опытом сотрудничества в области биоэтики, а также реальным форматом «Соглашения по санитарной охране территории государств — членов СНГ» и «Среднесрочного плана совместных действий по борьбе с инфекциями» [54, 72].

По модели, включающей характеристику пандемии, законодательство в области вакцинопрофилактики, организацию вакцинации и этические вызовы, были представлены национальные данные от 6 стран СНГ.

Азербайджанская Республика (АР)

Первый случай заражения COVID-19 зарегистрирован в Азербайджане 28 февраля 2020 г., что, с учетом мировой пандемии, стало основанием для введения особого карантинного режима и принятия соответствующих оперативных решений руководством страны.

Указом Президента Азербайджанской Республики «О мерах по охране здоровья населения

и усилению борьбы с коронавирусной инфекцией в Азербайджанской Республике» был создан Фонд поддержки борьбы с COVID-19 [43].

В январе 2021 г. утверждена «Стратегия по борьбе с COVID-19 на 2021–2022 гг.», цель которой — «искоренить... COVID-19 путем вакцинации, тем самым снижая уровень заболеваемости и смертности» [60]. Следует констатировать приверженность Азербайджана к осуществлению вакцинации на законодательной основе при обеспечении прав и свобод граждан [49].

Согласно закону АР «Об иммунопрофилактике инфекционных заболеваний», государство относится к реализации политики в сфере иммунопрофилактики основываясь на принципах необходимости, добровольности (информированное согласие), доступности (бесплатно и локально), государственного контроля за выбором вакцин, безопасности и эффективности, показаний/противопоказаний и поствакцинальных реакций, информирования населения, обучения кадров и подготовки медицинских учреждений, социальной защиты граждан, совершенствования статистического учета и международного сотрудничества.

В Азербайджане применяются препараты Sinovac, Sputnik V, Pfizer и AstraZeneca/Vaxzevria, в стране введено 11 562 620 доз вакцин (включая вторую — 46%), доля охвата на 19.01.22 хотя бы одной дозой всего составила 50,93%. Число инфицированных на 20.01.22 всего составило 629 352 — 6,2% [84].

Доступность вакцинации обеспечена на сайте по услуге «COVID-19 вакцина рандеву», что позволяет записаться в онлайн-очередь. Законодательно вакцинация проводится в несколько этапов: в первый охватываются медработники, лица старше 65 лет, сотрудники правоохранительных органов, участвующие в противоэпидемических мероприятиях, во второй — лица с высокими медицинскими рисками, страдающие хроническими заболеваниями, работники образовательной и социальной сферы, общественного транспорта, сотрудники телекоммуникаций, почтового и банковского секторов, находящиеся в прямом контакте с населением, постоянные жильцы социальных учреждений, лица, работающие в условиях повышенного риска (в значимых областях с наиболее высокой степенью риска: национальной и региональной безопасности, юстиции, финансов и т. д.) [60].

Лицам, получившим две дозы любой из вакцин, применяемых в Азербайджане, выдается вакцинный сертификат, а переболевшим COVID-19 и прошедшим официальную регистрацию — иммунный сертификат.

Процесс вакцинации ведется успешно в связи с тем, что созданы и активно функционируют экспертные группы реагирования, состоящие из профильных специалистов, а также в целях информирования населения и предотвращения необоснованной дезинформации открыты телефоны доверия. Основная часть населения Азербайджана поддерживает вакцинацию, и проблема антипрививочников не носит масштабного характера. Также в стране нет организаций и общин, ратующих за отказ от прививок, в отличие от государств, где некоторые общины выступают против вакцинации.

В стране вакцинировано 46% населения [84], лицам, не имеющим паспорта вакцинации или иммунного сертификата, в публичные места доступ ограничен. Этот принцип хорошо иллюстрирует высказывание М.А. Бакунина по этике защиты прав человека и основных свобод: «Свобода одного заканчивается там, где начинается свобода другого» [4]. Политика корректного подхода к вакцинации формируется путем последовательной работы с обществом правительства и ответственных государственных структур, технической поддержкой международных организаций и профессиональных сообществ Азербайджана. В этой связи Ассоциация Педиатров АР совместно с сотрудниками Медицинского университета и профильных структур Российской Федерации, США и Европы организовывали онлайн-вебинары и конференции по проблеме вакцинации и лечению пациентов с COVID-19. Специально для медперсонала, осуществляющего вакцинацию, дважды, в 2020 и 2021 гг., проведены целевые тренинги (Vaccine Trust Course), в сотрудничестве с Международной ассоциацией педиатров (IPA) и Sabin Vaccine Institute.

Таким образом, этическая составляющая вакцинации в Азербайджане построена и наполнена ведущими компонентами открытости и объективности информации и сотрудничества. Это способствует улучшению практики работы с населением, поддержке пациентов в различных ситуациях путем подготовки мотивирующих и просветительских видеороликов и постов для медицинских сайтов, СМИ, социальных сетей, памяток в пунктах вакцинации и материалов на каналах YouTube.

Республика Армения (РА)

Первый случай COVID-19 был выявлен в Армении 1 марта 2020 г. у гражданина Армении, который 28 февраля 2020 г. вернулся из Ирана [53]. Дальнейшая динамика распространения COVID-19 в РА представлена национальными и международными ресурсами и постоянно обновляется [10]. По решению Правительства РА в стране начиная с марта 2020 г. последовательно были введены чрезвычайная ситуация (ЧС), комендантский час, пе-

ревод на удаленную работу и обучение, открыт круглосуточный «Оперативный телефонный центр» с целью оперативной информации о мерах защиты от инфекции. В настоящее время вплоть до 20 июня 2022 г. действует карантин. Учитывая геополитическое положение страны и нахождение многих граждан Армении вне ее территории, особое внимание было уделено профилактике распространения инфекции COVID-19 путем ограничений на поездки и проведению международных консультаций по линии МИД Армении в дипломатических представительствах за рубежом и аккредитованных в Армении послов [26, 76].

Вакцинация в Армении стартовала 13.04.21 для всех жителей страны и иностранных граждан, бесплатно, по предварительной записи. Доступны 6 вакцин: AstraZeneca (Великобритания–Швеция), Спутник V и Спутник Лайт (для ревакцинации) (Россия), Moderna (США) Sinopharm и CoronaVac (Китай) [10].

Процесс вакцинации подкреплен внесением поправок в пакет соответствующих законов. Все непривитые сотрудники учреждений и организаций с 01.12.21 должны каждые 7 дней предоставлять действительный в течение 72 часов сертификат, подтверждающий отрицательный результат ПЦР-теста. Исключение, помимо вакцинированных, составляют лица с противопоказаниями от прививок, беременные, лица моложе 18 лет и ранее переболевшие (90 дней после первого положительного ПЦР-теста). Особое внимание уделяется вакцинации медиков и военных [6]. Существует система постоянного реагирования на состояние общества и отношения к пандемии [19, 20].

Дискуссии затронули все слои общества. Армянская апостольская церковь 12.11.22 высказала свое отношение к вакцинации, отметив, что «прививка от болезни не представляет духовной опасности для верующих, а в условиях пандемии, кроме личной свободы, необходимо думать и об ответственности перед обществом и не подвергать угрозе ни себя, ни окружающих» [23]. Тем не менее темпы вакцинации в Армении недостаточны, к январю 2022 г. полностью привиты (две дозы) 35,7%, частично (одна доза) — 43,7% взрослого населения [10]. Отношение людей к вакцинации неоднозначно, прививки зачастую делаются по административным причинам.

Таким образом, можно констатировать обеспеченность граждан РА вакцинами, наличие выбора и доступность, открытую политику информации по ограничениям. Однако показатели вакцинации свидетельствуют о лимите приверженности общества, что требует актуального применения объективного просветительского и информационного ресурса.

Кыргызская Республика (КР)

В Кыргызстане отмечалась следующая динамика событий по COVID-19: в январе 2020 г. объявлена ЧС в области общественного здравоохранения и создан Республиканский штаб по вопросам здравоохранения и социально-экономических мер реагирования [44]. В начале марта 2020 г. вышло распоряжение о принятии оперативных мер и введен ряд ограничений: отмена международных рейсов, развлекательных мероприятий, закрытие школ и ВУЗов, режим самоизоляции и удаленной работы [39].

Первые три случая заболевания COVID-19 зафиксированы 18.03.20 у граждан, вернувшихся после паломничества из Саудовской Аравии, а 22.03.20 Советом безопасности КР на всей территории страны введен режим ЧС [48]. Первый смертельный исход от COVID-19 зарегистрирован 25.03.20.

29 мая 2020 г. Правительство КР приняло план реагирования на пандемию с определением 6 приоритетных направлений, среди которых первое место отводилось здоровью [48]. 30.07.20 смертность от COVID-19 достигла 1347 случаев, и был объявлен день национального траура.

С конца 2020 г. по рекомендации ВОЗ Республиканский штаб КР принял решение о вакцинации 70% населения с помощью COVAX (20%), донорской поддержки, закупки вакцин за счет бюджета и международных соглашений. 03.02.21 разработан национальный план вакцинации и намечен поэтапная алгоритм его введения для приоритетных групп [35]. В феврале–марте 2021 г. развернуто 846 временных прививочных пунктов, создан электронный реестр вакцинированных, к концу августа 2021 г. было привито 76% сотрудников Министерства обороны и более 80% МЧС [46]. С 20 декабря 2021 г. начата «бустерная» иммунизация всех получивших курс первичной вакцинации [67]. На 18 января 2022 г. в Кыргызстане вакцинировано 47% населения [9].

В стране обеспечена система массовой вакцинации всех граждан против COVID-19 по Национальной программе развития КР до 2026 г. за счет равного доступа и права выбора вакцин, государственного контроля безопасности, мониторинга побочных эффектов, актуализации соответствующих решений и интеграции базы данных о вакцинированных и тестированных лицах с базами других стран [36].

Таким образом, в Кыргызстане приняты оперативные меры предупреждения распространения COVID-19, обеспечен нормативно-правовой механизм поддержания общественного здоровья на основе равного доступа к медицинской помощи, вакцинации и социальной поддержке. Особое внимание уделено уязвимому контингенту: мигрантам, пожилым людям,

многодетным семьям, беременным женщинам, пациентам с ВИЧ, туберкулезом, онкологией и другими социально значимыми заболеваниями и созданы условия для морально-психологической помощи населению [2].

Республика Молдова (РМ)

Первый случай заражения COVID-19 зарегистрирован в Молдове 7 марта 2020 г. у вернувшейся из Италии гражданки РМ. В связи с быстрым ростом случаев заражения уже 17 марта Парламент страны объявил чрезвычайное положение [47]. Динамика развития пандемии освящена на статистических сайтах страны, СНГ, ВОЗ [11].

С учетом целей данного исследования следует отметить готовность РМ к иммунизации на постоянной нормативной основе посредством реализации серии национальных планов иммунизации (НПИ), в которых определены и условия «обязательной иммунизации». Охват вакцинацией против управляемых инфекций релевантных групп в 2003–2008 гг. достигал 95–98%. Впоследствии с ростом антивакцинальной пропаганды в социальных сетях и отсутствием эффективных практик по просвещению, имело место поступательное снижение охвата до 90–92% (2003–2008) и в отдельных районах страны до 80–90% (2015) [93]. В законе № 10 от 03.02.2009 «О государственном надзоре за общественным здоровьем» указано на ограничение допуска детей в коллективы в зависимости от наличия профилактических прививок (статья 52, п. 6) [41]. Такова фоновая по отношению к развитию пандемии ситуация по иммунизации в Молдове. В 2021 г. был одобрен НПИ COVID-19, в котором предусмотрена обязанность государства обеспечить доступ населения к качественной вакцине, безопасную вакцинацию, правильную пропаганду и широкое информирование о вакцине. Дано описание организации процесса вакцинации, указаны целевые группы, приоритетная вакцинация уязвимых лиц и групп повышенного риска [37].

Вакцинация в РМ против COVID-19 обеспечена путем участия в программах COVAX, ГАВИ, ВОЗ и CEPI на основании одобрения заявки МЗ Молдовы от 30.08.2020. 7 декабря 2020 г. МЗ подала заявку на вакцину против COVID-19 («часть А») для COVAX и впоследствии, 30 декабря 2020 г., также представила «часть Б» [37]. В марте 2021 г. Республика Молдова получила 14 400 доз вакцин против COVID-19 и стала первой страной в Европейском регионе, которая получила вакцины от COVID-19 через COVAX [74]. Вакцинация в Молдове началась 05.03.2021. В стране доступны вакцины AstraZeneca, Pfizer, Janssen/Johnson & Johnson, Sinopharm, CoronaVac, Спутник V, обеспечена возможность добровольного и бесплатного выбора препарата при обращении к семейному врачу или в любом центре вакцинации [57]. С 29.11.21 началась бустерная вакцинация основных групп риска [51]. Однако наличие и достаточный выбор вакцин не компенсирует высокую степень резистентности населения, и охват вакцинацией населения страны достигает на данный момент около 30% [57]. Молдова, помимо доступа для граждан страны, открыла доступ к вакцинации иностранцам, желающим привиться одобренными ВОЗ препаратами, и стала популярным местом вакцинного туризма [18].

Низкий уровень вакцинации обусловлен недоверием большинства граждан к вакцинам, что подтверждается результатами социологических исследований [3]. К одним из самых «вредных» явлений пандемии COVID-19 относится обилие ложной и манипулятивной информации, которая выпускалась и продолжает выпускаться в публичное пространство. С началом вакцинации в социальных сетях появилась искаженная информация о компонентах и безопасности вакцин, их побочных эффектах и постиммунизационной летальности.

Особую роль сыграла церковь. В начале пандемии Митрополия Молдовы скептически относилась к иммунизации, даже отправила открытое обращение президенту страны с просьбой не допускать вакцинацию против COVID-19, летом 2020 г. в Кишиневе была организована манифестация против обязательной вакцинации, несмотря на отсутствие такой нормы [8, 16]. В настоящее время наблюдается тенденция к улучшению ситуации, все больше и больше служителей церкви, в том числе из тех, которые сдержанно относились к вакцинации и даже продвигали всевозможные мифы о ней, пересмотрели свое мнение, вакцинировались сами и начали призывать прихожан ответственно относиться к своему здоровью и к здоровью окружающих.

Среди негативных явлений следует также отметить нередкие случаи фальсификации тестов и справок о прививках (сертификатов вакцинации), в том числе и выданных медицинскими работниками [61, 63].

Таким образом, ведущими этическими вызовами в проведении вакцинации в Молдове стали пробелы в формировании приверженности к вакцинации у различных категорий населения, включая уязвимые контингенты и группы профессиональной и конфессиональной ответственности (медработники и служители церкви). В целом степень, в которой представители народности рома пользуются медицинскими услугами, определяется доступом, образом жизни, миграцией и недостатком знаний при оценке рисков для здоровья. В связи с этим приоритетом социальной и этической практи-

ки является улучшение доступа к вакцинам, содействие реализации комплексных коммуникационных программ на базе правильного информирования и пропаганды вакцинации, и борьба с «вакцинной нерешительностью».

Республика Таджикистан (РТ)

Датой начала пандемии COVID-19 в Таджикистане является 30 апреля 2020 г. Динамика распространения COVID-19 в стране представлена данными национальной статистики, ВОЗ, СНГ и другими источниками [13, 24]. Учитывая характер настоящей статьи, посвященной вопросам этики вакцинации, следует подчеркнуть правовые нормы вакцинопрофилактики, закрепленные Конституцией РТ, где высшей ценностью признаны права и свобода человека (ст. 14).

Основными профильными нормативными актами служат закон РТ № 680 «Об иммунопрофилактике инфекционных болезней» (29.12.2010), постановление Правительства РТ № 211 «О проведении массовой иммунизации в РТ» (17.03.1995) и Кодекс здравоохранения РТ (2017 г.) [38]. Кодекс в целом регулирует общественные отношения в области здравоохранения и направлен на реализацию конституционных прав граждан, включая проведение клинических и медико-биологических испытаний (ст. 65), профилактические, плановые и обязательные прививки (ст. 106), предупреждение возникновения и распространения массовых инфекционных заболеваний (ст. 107).

Для оперативной работы в пандемию распоряжением Президента РТ 18.03.20. был создан республиканский штаб и приняты целевые нормативные акты, в том числе по иммунизации против COVID-19 в РТ (22.03.21). В соответствии с этим документом 23.03.21 была официально начата кампания вакцинации в Таджикистане [7]. Следует подчеркнуть, что на основании анализа проблем с вакцинацией в мире вакцинация была объявлена обязательной для граждан старше 18 лет с пояснением, что данная мера не является принудительной, а направлена на убеждение и достижение результата. Вакцинация производится на бесплатной основе, с мониторингом поствакцинальных реакций, в первую очередь включает контингенты высокого социального и медицинского риска (врачей, учителей, государственных служащих и пожилых людей). Страна обеспечена 5 вакцинами: CoronaVac, AstraZeneca, Moderna, Pfizer и Спутник V. В настоящее время вакцинировано 68,6% взрослого населения страны. Вторую дозу вакцины от COVID-19 получили 57%, начата ревакцинация третьей дозой врачей в Душанбе [7].

Поскольку важными вопросами с точки зрения этики является качество вакцин, характер их испытания и применения, то дефицит таких данных был широко использован в антивакцинальной пропаганде, в том числе и среди различных религиозных конфессий. Некоторые религиозные лидеры призывали верующих отказаться от вакцинации из-за нехаляльности вакцин (ислам) или использования клеток человеческого эмбриона (христианство) [83].

Принципиальным с этических позиций является объективное информирование общества и наличие обратной связи с гражданами. В этом плане чрезвычайно значимы результаты участия Таджикистана в международном социологическом проекте [66].

Поддержали массовую вакцинацию в Таджикистане 76,6% из 1000 опрошенных респондентов. Выявлен лимит доверия к медицине: так, рекомендациям по профилактике и лечению от COVID-19 доверяют только 72% респондентов. Сделаны важные выводы о необходимости расширения знания о вакцинации самих медицинских работников и повышения их степени доверия, корректной подготовки информации для общества с целью профилактики публикации недостоверных материалов. Рекомендуется выработка единой стратегии вакцинации в соответствии с социокультурным статусом: например, сделан важный акцент по учету отношения к вакцинации женщин, поскольку они чаще выступают в пользу вакцинации по причине «защиты семьи» [66].

Таким образом, в Таджикистане имеет место четкое представление о необходимости и путях достижения этики вакцинации посредством формирования у населения «эпидемиологической культуры» и «эпидемиологического поведения», совершенствования информационных каналов, привлечения к работе гражданского сектора, выработки совместной стратеги вакцинации против COVID-19 с религиозными лидерами, объединениями и организациями.

Республика Узбекистан (РУ)

Первый случай COVID-19 в Узбекистане был выявлен у гражданки Узбекистана, вернувшейся из Франции 15 марта 2020 г. [100]. Уже с 16 марта 2020 г. было начато введение мер по прекращению сообщения с другими странами, карантину в образовательных и социальных учреждениях, отмене массовых мероприятий, переводу организаций на дистанционный режим. Все противоэпидемические мероприятия проводятся в полном соответствии с действующим нормативно-правовым государственным режимом [15].

Законодательство Республики Узбекистан имеет убедительную нормативную базу для проведения обязательной вакцинации в условиях эпидемической угрозы. Согласно статьям 10

и 30 закона «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» от 26.08.15, главный государственный санитарный врач при угрозе возникновения и распространения инфекционных и паразитарных заболеваний уполномочен проводить соответствующие санитарно-гигиенические и противоэпидемические мероприятия, включающие профилактические прививки [62]. На основании СанПиН №0239-07 «Иммунопрофилактика инфекционных заболеваний» в график прививок включена вакцинация от COVID-19. С началом пандемии было принято решение «О внесении изменений и дополнений в Уголовный, Уголовно-процессуальный кодексы РУ и Кодекс РУ об административной ответственности» (26.03.20). В статье 54 указаны виды нарушений правил борьбы с эпидемиями и введена новая статья 29-2, предусматривающая применение принудительных мер медицинского характера (карантин, изоляция, лечение) для лиц, нарушивших правила борьбы с эпидемиями [40].

Массовая вакцинация в Узбекистане стартовала 1 апреля 2021 г. По сведениям МЗ РУ, на данный период число граждан, инфицированных коронавирусной инфекцией, в стране достигло 83 239 (+189). Населению доступны 5 вакцин: Anhui Zhifei Longcom Biopharmaceutical (производство в РУ), CoronaVac, Спутник V (производство в РУ), AstraZeneca, Moderna и Pfizer [23]. По данным на 30.12.21 вакцинировано 55,01% населения республики, из них двукратно — 34,47% [19, 69].

Рассматривая этические проблемы, следует отметить, что пандемия COVID-19 поставила перед перегруженными системами здравоохранения серьезный вопрос о возможности заботиться о пациентах безопасным, справедливым и эффективным способом [75, 82, 87, 95]. В соответствии с резолюцией ООН, «объявление чрезвычайного положения в связи с эпидемией COVID-19 не должно использоваться как основание для преследования отдельных групп, меньшинств и т. д.; служить прикрытием для репрессивных действий под предлогом защиты здоровья населения... и не должно использоваться для одного лишь подавления недовольства» [12]. В связи с этим в Узбекистане начата совместная работа ЮНИСЕФ и ВОЗ по построению публичного диалога о вакцинации для устранения необоснованных страхов и дезинформации в общинах страны [73].

Таким образом, к числу ведущих этических вызовов вакцинации в Узбекистане можно отнести необходимость четкого соблюдения принципов соразмерности, адекватного и открытого информирования, построения диалога с обществом для достижения доверия, наращивания темпов вакцинации и других мер по управлению пандемией.

Обсуждение и заключение

Особое значение данного исследования заключается в комплексном подходе к этике вакцинации, включающем классический регламент этической экспертизы вакцин, опыт и анализ соблюдения этического содержания вакцинации против COVID-19 в ряде стран СНГ. Выявлена наиболее общая причина низкой приверженности населения стран Содружества к вакцинации, которая заключается в различном по степени выраженности недоверии общества, что характерно в целом для глобальной кампании вакцинации против COVID-19 в мире. Выявление особенностей формирования дефицита доверия и путей его преодоления в различных странах способствует достижению единства ответственности по созданию концепции разрешения этических конфликтов на основе стандарта этических принципов вакцинации в условиях пандемии. Резюмируя информацию о предложенных принципах, следует отметить специфическое назначение каждого из них.

Принцип необходимости зиждется на четком определении масштаба, продолжительности, интенсивности применения конкретных вакцин адекватно существующей угрозе и с учетом динамики эпидемиологических/иммунологических откликов и социально-политических последствий.

Принцип соразмерности предполагает понимание и постоянную ориентацию на то, чтобы моральный и социальный отклики были соразмерны с преимуществом, которое предполагается получить в результате проводимой вакцинации и в случае, когда не существует других способов достижения критически необходимых мер по сдерживанию инфекции.

Принцип различия призван выявить и установить объективные критерии для персонализированного назначения различных по механизму действия вакцин разным группам и контингентам в зависимости от клинических, эпидемических, социальных и профессиональных рисков.

Принципы правомерности и ограничения включают обязанность уполномоченных органов применять незапрещенную нормами действующего права организацию вакцинации, сводя к минимуму непредусмотренные законом и смыслом ограничения прав и свобод.

Принцип гуманности заключается в уважении и защите лиц, которые приравнены к уязвимому контингенту по социальным, возрастным, психологическим, административным, политическим признакам, не могут заявлять и отстаивать самостоятельно свои права, не принимают непосредственного участия в принятии решения

или прекратившие принимать участие в процессе вакцинации по любой другой причине.

Принципы слежения, предупреждения и коррекции неразрывно связаны и предполагают осуществление динамического мониторинга за последствиями вакцинации, постоянную информационную, организационную и логистическую адаптацию, включая возможность замены/приостановки применения средств и методов вакцинации, что должно позволить избежать/минимизировать непредусмотренные риски и своевременно принять в оборот перспективные и актуальные меры управления пандемией.

Принцип ответственности за правонарушение в сфере противодействия этическим принципам вакцинации включает обязанность уполномоченных государственных органов, профессиональных структур и отдельных лиц, вовлеченных в процесс вакцинации, способствовать корректному информационному обеспечению и образованию в сфере применения этических принципов вакцинации.

В качестве общего заключения следует подчеркнуть, что достижение гармонического внедрения предложенной системы этических ориентиров должно напрямую способствовать созданию научно обоснованной и нравственно приемлемой базы для формирования общественного доверия и добровольной приверженности вакцинации.

Список литературы/References

1. 20 мая 2021 г. состоялся круглый стол «Вакцинация: этические аспекты в свете православного вероучения» // Общество православных врачей Санкт-Петербурга. [Roundtable discussion "Vaccination: ethical aspects in an orthodox doctrine" was held on May 20, 2021. Society of Orthodox Doctors of St. Petersburg. *(In Russ.)*] *URL: http://www.opvspb.ru/society/news/457*
2. 76% сотрудников Министерства обороны вакцинировались от COVID, 25 августа 2021. [76% of Department of Defense employees have been vaccinated against COVID. August 25, 2021. *(In Russ.)*] *URL: https://zdorovie.akipress.org/news:1725790*
3. АДЕПТ. Управление пандемическим кризисом с помощью мер иммунизации и защиты, август–декабрь 2021 года: отчет. 31 с. [На румынском]. [ADEPT. Managing the pandemic crisis through immunization and protection measures, August–December 2021: report. 31 p. (In Romanian)] *URL: http://www.e-democracy.md/files/raport-covid-19-moldova-2021.pdf*
4. Бакунин М.А. Бог и государство. Сергиев Посад: Солдат-Гражданин, 1917. 60 с. [Bakunin M.A. God and The State. *Sergiev Posad: Soldier-Citizen, 1917. 60 p. (In Russ.)*]
5. Благов А.В., Букаева А.А., Макаров В.В., Бочкарева З.В. Эффективность и безопасность РНК-вакцин: что известно на сегодняшний день // Медицинская иммунология. 2021. Т. 23, № 5. С. 1017–1030. [Blagov A.V., Bukaeva A.A., Makarov V.V., Bochkaeva Z.V. Safety and efficacy of RNA vaccines: State of the art. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2021, vol. 23, no. 5, pp. 1017–1030. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/1563-0625-SAE-2320*
6. В Армении началась вакцинация медработников против Covid-19 // ArmenPress. [The Covid-19 vaccination of medical workers has started in Armenia. ArmenPress. *(In Russ.)*] *URL: https://armenpress.am/rus/amp/1045776*
7. В Душанбе началась компания вакцинации против COVID-19 среди граждан старше 18 лет // Национальное информационное агентство Таджикистана «Ховар». [A vaccination campaign against COVID-19 among citizens over the age of 18 has begun in Dushanbe. Khovar National Information Agency of Tadzhikistan. *(In Russ.)*] 25.06.2021. *URL: https://khovar.tj/rus/2021/06/v-dushanbe-nachalas-kampaniya-vaktsinatsii-protiv-covid-19-sredi-grazhdan-starshe-18-let*
8. В Кишиневе проходит протест против обязательной вакцинации от коронавируса // NewsMaker. [A protest against mandatory vaccination against coronavirus is taking place in Chisinau. NewsMaker. *(In Russ.)*] 03.08.2021. *URL: https://newsmaker.md/rus/novosti/v-kishineve-prohodit-protest-protiv-obyazatelnoy-vaktsinatsii-ot-koronavirusa-video*
9. В Кыргызстане вакцинировано 47% населения // Здоровье. АКИpress. [47% of population vaccinated in Kyrgyzstan. Health. AKIpress. *(In Russ.)*] 18.01.2022. *URL: https://zdorovie.akipress.org/news:1757135*
10. Вакцинация от коронавируса в Армении // ArmeniaGid.com. [Coronavirus vaccination in Armenia. ArmeniaGid.com. *(In Russ.)*] *URL: https://armeniagid.com/voprosy/vaktsinatsiya-ot-koronavirusa*
11. ВОЗ. Вопросы и ответы: коллективный иммунитет, меры самоизоляции и COVID-19. [WHO. Questions and answers: collective immunity, and self-isolation measures COVID-19. *(In Russ.)*] *URL: https://www.who.int/ru/news-room/questions-and-answers/item/herd-immunity-lockdowns-and-covid-19*
12. ВОЗ. Вступительное слово Генерального директора на пресс брифинге по COVID-19, 12 октября 2020 г. [WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 — 12 October 2020. *(In Russ.)*] *URL: https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---12-october-2020*
13. ВОЗ. Техническая миссия Всемирной организации здравоохранения по проведению экспертной оценки ситуации с COVID-19 в Таджикистане: 1–11 мая 2020 г. ВОЗ, 2020. 16 с. [WHO. Technical mission of the World Health Organization to conduct an expert assessment of the situation with COVID-19 in Tajikistan on May 1–11, 2020. *WHO, 2020. 16 p. (In Russ.)*]
14. ВОЗ. Цифровая документация для сертификатов о вакцинации против COVID-19: статус вакцинации — технические спецификации и руководство по внедрению, 17 августа 2021. ВОЗ, 2021. 105 с. [WHO. Digital documentation for COVID-19 Vaccination Certificates: Vaccination Status — Technical Specifications and Implementation Guide, August 17, 2021. *WHO, 2021. 105 p. (In Russ.)*]
15. ВОЗ. COVID-19 — национальный стратегический план обеспечения готовности и реагирования в области здравоохранения: отчет за 2020 год. Узбекистан: ВОЗ, 2020. 34 с. [WHO. COVID-19 — national strategic preparedness and response plan for health: report for 2020. *Uzbekistan: WHO, 2020. 34 p. (In Russ.)*]
16. Выприцких А. Митрополия Молдовы: Вакцинация от нового типа коронавируса должна быть добровольной // NewsMaker. [Vypritskykh A. Metropolia of Moldova: vaccination against COVID-19 and implantation of microchips should be voluntary. NewsMaker. *(In Russ.)*] 19.05.2020. *URL: https://newsmaker.md/rus/novosti/mitropoliya-moldovy-vaktsinatsiya-ot-novogo-tipa-koronavirusa-dolzhna-byt-dobrovolnoy*

17. Гончарова В.Е. Этические вопросы проведения клинических исследований и вакцинации против COVID 19 // Медицинская этика. 2021. Т. 10, № 2. С. 35–40. [Goncharova V.E. Ethical issues of conducting clinical trials and vaccination against COVID 19. *Meditsinskaya etika = Medical Ethics, 2021, vol. 10, no. 2, pp. 35–40. (In Russ.)*]
18. Горчак О., Дерменжи Д. Конец вакцинным турам в Молдову? Минздрав рассказал о вакцинации иностранцев // NewsMaker. [Gorchak O., Dermenzhi D. End of vaccine tours to Moldova? Ministry of Health spoke about the vaccination of foreigners. NewsMaker. *(In Russ.)*] *URL: https://newsmaker.md/rus/novosti/konets-vaktsinnym-turam-v-moldovu-minzdrav-rasskazal-o-vaktsinatsii-inostrantsev*
19. Давтян С.А. Коронавирус // Газета «Христианская Армения». 09.2021. № 18 (590). С. 5 и 8 [На арм.]. [Davtyan S.A. Coronavirus. Christian Armenia Newspaper, 09.2021, no. 18 (590), pp. 5 and 8 *(In Armenian)*]. *URL: https://krishayas.files.wordpress.com/2021/09/krist-2021-aug-2.pdf*
20. Давтян С.А. Коронавирус должен изменить образ мышление людей // Газета «Аравот» [На арм.]. [Davtyan S.A. Coronavirus should change the way people think, newspaper. Aravot News. *(In Armenian)*] 29.10.2021. *URL: https://www.aravot.am/2021/10/29/1225350*
21. Для некоторых групп населения Узбекистана вводится обязательная вакцинация (список) // Газета.uz. [Obligatory vaccination is being introduced for some groups of the population of Uzbekistan (list). Gazeta.uz *(In Russ.)*] 17.07.2021. *URL: https://www.gazeta.uz/ru/2021/07/17/compulsory-vaccination*
22. Доклад Святейшего Патриарха Кирилла на Епархиальном собрании г. Москвы (22 декабря 2021 г.) // РПЦ: официальный сайт Московского патриархата. [His Holiness Patriarch Kirill's speech on the Eparchial meeting, Moscow. December 22, 2021. Russian Orthodox Church: Moscow Patriarchy Official Website. *(In Russ.)*] *URL: http://www.patriarchia.ru/db/text/5874415.html*
23. Духовной опасности для верующих в вакцинации нет — Армянская апостольская церковь // Sputnik. Армения. [There is no spiritual danger in vaccination for believers — Armenian Apostolic Church. Sputnik. Armenia. *(In Russ.)*] 12.11.2021. *URL: https://ru.armeniasputnik.am/20211112/dukhovnoy-opasnosti-dlya-veruyuschikh-v-vaktsinatsii-net--armyanskaya-apostolskaya-tserkov-35296492.html*
24. Единый национальный портал о коронавирусе (COVID-19). [Unified National Portal about Coronavirus (COVID-19)]. *URL: https://covid.tj*
25. Есть 6 вакцин: Sputnik V, Pfizer и другие. А какая лучше? — изучаем вместе // Sputnik. Узбекистан. [There are 6 vaccines: Sputnik V, Pfizer and others. Which one is better? — Let's find out together. Sputnik. Uzbekistan. *(In Russ.)*] 19.02.2021. *URL: https://uz.sputniknews.ru/20210219/16044005.html*
26. Заявление Министерства иностранных дел Республики Армения об ограничениях, введенных для предотвращения распространения нового типа коронавируса // Сайт Министерства иностранных дел Республики Армения. [Statement of the Ministry of Foreign Affairs of the Republic of Armenia on the restrictions imposed to prevent the spread of a new type of coronavirus. Ministry of Foreign Affairs of the Republic of Armenia Website. *(In Russ.)*] 28.03.2020. *URL: https://www.mfa.am/ru/COVID-19?page=2*
27. Карташова М.К., Киселева Я.В., Семенистая М.Ч., Павлов Ч.С. Вакцинопрофилактика: оценка вклада в схемах терапии и прогноза инфекции // Медицинская этика. 2021. Т. 10, № 2. С. 41–44. [Kartashova M.K., Kiseleva Ya.V., Semenistaya M.Ch., Pavlov Ch.S. Vaccination: assessment of the contribution to the schemes of therapy and infection prognosis. *Meditsinskaya etika = Medical Ethics, 2021, vol. 10, no. 2, pp. 41–44. (In Russ.)*]
28. Коронавирусные ограничения и вакцинация граждан стали одними из ключевых тем в интервью председателя Духовного управления мусульман Российской Федерации Муфтия Шейха Равиля Гайнутдина для телеканала «Россия 24» // Совет муфтиев России. [Coronavirus restrictions and vaccination of citizens became one of the key topics in an interview with the chairman of the Spiritual Administration of Muslims of the Russian Federation, Mufti Sheikh Ravil Gainutdin for the TV channel "Russia 24". Russian Mufti Counsel. *(In Russ.)*] 20.07.2021. *URL: https://muslim.ru/articles/278/30656*
29. Кубарь О.И. Этический комментарий к COVID-2019 // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 2. С. 287–294. [Kubar O.I. Ethical comments on COVID-19. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2020, vol. 10, no. 2, pp. 287–294. (In Russ.)*]
30. Кубарь О.И., Асатрян А.Г., Харит С.М., Михайлова Н.А. Этическая экспертиза исследований вакцин // Руководство для комитетов по этике / Под ред. А.Л. Хохлова. М.: Изд-во ОКИ, 2021. С. 313–335. [Kubar O.I., Asatryan A.G., Kharit S.M., Mikhailova N.A. Ethical review of vaccine research. In: Guidelines for ethics committees. Ed. by A.L. Khokhlov. *Moscow: OKI Publishing House, 2021, pp. 313–335. (In Russ.)*]
31. Кубарь О.И., Бичурина М.А., Романенкова Н.И. Второй этический комментарий к COVID-19 (год спустя) // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 1. С. 17–24. [Kubar O.I., Bichurina M.A., Romanenkova N.I. The second ethical commentary on COVID-19 (a year later). *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2021, vol. 11, no. 1, pp. 17–24. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-SEC-1645*
32. Кубарь О.И., Бичурина М.А., Романенкова Н.И. Концепция информированного согласия от исторических корней до красной линии современных кризисных ситуаций в инфекционной патологии // Медицинская этика. 2021. № 1. С. 56-63. [Kubar O.I., Bichurina M.A., Romanenkova N.I. The concept of informed consent from historical roots to the red line of modern crisis situations in infectious pathology. *Meditsinskaya etika = Medical Ethics, 2021, no. 1, pp. 56–63. (In Russ.)*]
33. Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Саркисян Н.С., Волынкина А.С. COVID-19 как зоонозная инфекция // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 4. С. 617–623. [Kulichenko A.N., Maletskaya O.V., Sarkisyan N.S., Volynkina A.S. COVID-19 as a zoonotic infection. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2021, vol. 11, no. 4, pp. 617–623. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-CAA-1621*
34. Микиртичан Г.Л. Исторический аспект этико-правовых отношений в инфекционной патологии // Этика инфекционной патологии / Под ред. О.И. Кубарь. СПб.: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2014. С. 8–40. [Mikirtichan G.L. Historical aspect of ethical and legal relations in infectious pathology. In: Ethics of infectious pathology. Ed. by O.I. Kubar. *St. Petersburg: St. Petersburg Pasteur Institute, 2014, pp. 8–40. (In Russ.)*]
35. Минздрав разработал Национальный план по развертыванию вакцинации против COVID-19. Здоровье. АКИpress. [The Ministry of Health has developed the National Plan for COVID-19 Vaccination Rollout. Health. AKIpress. *(In Russ.)*] 09.02.2021. *URL: https://zdorovie.akipress.org/news:1679679*

36. Национальная программа развития Кыргызской Республики до 2026 года. [National Program of the Development of Kyrgyz Republic until 2026. *(In Russ.)*] *URL: http://www.stat.kg/media/files/3d033353-7e05-42ec-a282-8722459f5c31.pdf*
37. Национальный план Республики Молдова по иммунизации против COVID-19, одобрен Национальной чрезвычайной комиссией по общественному здравоохранению. Постановление № 41 от 13.01.2021. [National COVID-19 immunization plan of the Republic of Moldova. Approved by the National Emergency Commission on Public Health. Resolution No. 41 dated January 13, 2021. *(In Russ.)*] *URL: https://gov.md/sites/default/files/hotarire_cnesp_nr._41_din_13.01.2021_0.pdf*
38. Национальный центр законодательства при Президенте Республики Таджикистан. [National Center of Legislation under the President of the Republic of Tajikistan. *(In Russ.)*] *URL: http://ncz.tj*
39. О введении временного ограничения на всех контрольно-пропускных пунктах пропуска через Государственную границу Кыргызской Республики. Распоряжение Правительства Кыргызской Республики от 17.03.2020 № 84-р. [On the introduction of temporary restrictions at all checkpoints across the State Border of the Kyrgyz Republic. Order of the Government of the Kyrgyz Republic No. 84-p dated March 17, 2020. *(In Russ.)*] *URL: http://cbd.minjust.gov.kg/act/view/ru-ru/218021*
40. О внесении изменений и дополнений в Уголовный, Уголовно-процессуальный кодексы Республики Узбекистан и Кодекс Республики Узбекистан об административной ответственности. Закон Республики Узбекистан № ЗРУ-613 от 26.03.2020. [On amendments and additions to the Criminal, Criminal Procedure Codes of the Republic of Uzbekistan and the Code of the Republic of Uzbekistan on Administrative Responsibility. Law of the Republic of Uzbekistan No. ЗРУ-613 dated March 26, 2020. *(In Russ.)*] *URL: https://lex.uz/ru/docs/4774974*
41. О государственном надзоре за общественным здоровьем. Закон Республики Молдова № 10 от 03.02.2009. [On state supervision of public health. law of the Republic of Moldova No. 10 dated February, 2009. *(In Russ.)*] *URL: https://www.legis.md/cautare/getResults?doc_id=106570&lang=ru*
42. О мерах законодательного обеспечения трудовой миграции в период пандемии. Приложение к постановлению МПА СНГ от 26 ноября 2021 года № 53-5. [On legislative measures to ensure labor migration during the pandemic. Annex to the statement of the Interparliamentary Assembly of Member Nations of the Commonwealth of Independent States No. 53-5 dated November 26, 2021. *(In Russ.)*] *URL: https://iacis.ru/public/upload/files/1/991.pdf*
43. О мерах по охране здоровья населения и усилению борьбы с коронавирусной инфекцией в Азербайджанской Республике: указ Президента Азербайджанской Республики [На азерб.] // Официальный сайт Президента Азербайджанской Республики И.Г. Алиева. [On measures to protect public health and strength en the fight against coronavirus infection in the Republic of Azerbaijan: decree of the President of the Republic of Azerbaijan I.G. Aliyev. Official website of the President of the Republic of Azerbaijan. *(In Azerbaijanian)*]. *URL: https://its.gov.az/page/dokumenty]*
44. О принятии оперативных мер по преодолению экономических последствий, возникающих в связи с ситуацией по коронавирусу. Распоряжение Премьер-министра Кыргызской Республики № 136 от 05.03.2020. [On to take prompt action to overcome the economic consequences arising from the situation with the coronavirus. Order of the Prime Minister of the Kyrgyz Republic No. 136 dated March 5, 2020. *(In Russ.)*] *URL: http://cbd.minjust.gov.kg/act/view/ru-ru/218075*
45. О роли парламентов в противодействии COVID-19: совместное заявление Совета МПА СНГ и Европейского бюро ВОЗ [On the role of parliaments in countering COVID-19: joint statement of the IPA CIS Council and the WHO European Office. *(In Russ.)*] *URL: https://iacis.ru/public/userfiles/10_Прил%20Заявление%20ИТОГОВОЕ.pdf*
46. Об обеспечении экономической устойчивости, создания благоприятных и безопасных условий для развития предпринимательской деятельности, сохранения социальной стабильности: распоряжение Премьер-министра Кыргызской Республики № 117 от 25.02.2021. [On ensuring economic sustainability, creating favorable and safe conditions for the development of entrepreneurial activity, maintaining social stability: order of the Prime Minister of the Kyrgyz Republic No. 117 dated February 25, 2021. *(In Russ.)*] *URL: http://cbd.minjust.gov.kg/act/view/ru-ru/218445*
47. Об объявлении чрезвычайного положения: постановление Парламента Республики Молдова от № 55 17.03.2020. [On the declaration of a state of emergency: resolution of the Parliament of the Republic of Moldova No. 55 dated March 17, 2020. *(In Russ.)*] *URL: https://www.legis.md/cautare/getResults?doc_id=120817&lang=ru*
48. Об одобрении проекта Плана реагирования на коронавирусную инфекцию (COVID-19) и раннего восстановления по взаимодействию между Правительством Кыргызской Республики и Группой по координации реагирования на чрезвычайные ситуации: распоряжение Правительства Кыргызской Республики № 194-р от 29.05.2020. [On approval of the draft Coronavirus Infection (COVID-19) Response and Early Recovery Plan for interaction between the Government of the Kyrgyz Republic and the Emergency Response Coordination Group: order of the Government of the Kyrgyz Republic No. 194-p dated 29 May, 2020. *(In Russ.)*] *URL: http://cbd.minjust.gov.kg/act/view/ru-ru/218195*
49. Об охране здоровья населения: закон Азербайджанской Республики № 360-IQ от 26.06.1997 // Сайт Министерства юстиции Азербайджанской Республики [На азербайджанском]. [On protection of public health. Law of the Republic of Azerbaijan No. 360-IQ dated June 26, 1997. Ministry of Justice of the Republic of Azerbaijan. *(In Azerbaijanian)*] *URL: http://www.e-qanun.az/framework/752*
50. Основы социальной концепции Русской Православной Церкви. Основы учения Русской Православной Церкви о достоинстве, свободе и правах человека. М.: Издательство Московской Патриархии Русской Православной Церкви, 2018. 176 с. [The foundations of the social concept of the Russian Orthodox Church. Russian Orthodox Church's fundamentals of teaching about dignity, freedom and human rights. *Moscow: Publishing House of the Moscow Patriarchate of the Russian Orthodox Church, 2018. 176 p.*]
51. Относительно применения дополнительной дозы и бустерной дозы вакцины против COVID-19: приказ МЗ Республики Молдова № 1089 от 29.11.2021 [На молдавском]. [Regarding the use of an additional dose and booster dose of the vaccine against COVID-19: order of the Ministry of Health of the Republic of Moldova No. 1089 dated November 29, 2021. *(In Moldovan)*]. *URL: https://msmps.gov.md/wp-content/uploads/2021/11/Ordin-1089-%E2%80%9E-Cu-privire-la-aplicarea-dozei-suplimentare-s%CC%A6i-dozei-booster-de-vaccin-anti-COVID-19.pdf*
52. Папа римский Франциск сделал прививку от коронавируса // Новые известия. [Pope Francis has been vaccinated against coronavirus. Novye Izvestia. *(In Russ.)*] 14.01.2021. *URL: https://newizv.ru/news/world/14-01-2021/papa-rimskiy-frantsisk-sdelal-privivku-ot-koronavirusa*

53. Первый случай коронавируса выявили в Армении // Известия. [The first case of coronavirus was detected in Armenia. Izvestia. *(In Russ.)*] 01.03.2020. *URL: https://iz.ru/981803/2020-03-01/pervyi-sluchai-koronavirusa-vyiavili-v-armenii*
54. Попова А.Ю., Андреева Е.Е., Бабура Е.А., Балахонов С.В., Башкетова Н.С., Буланов М.В., Валеуллина Н.Н., Горяев Д.В., Детковская Н.Н., Ежлова Е.Б., Зайцева Н.Н., Историк О.А., Ковальчук И.В., Козловских Д.Н., Комбарова С.В., Курганова О.П., Кутырев В.В., Ломовцев А.Э., Лукичева Л.А., Лялина Л.В., Мельникова А.А., Микаилова О.М., Носков А.К., Носкова Л.Н., Оглезнева Е.Е., Осмоловская Т.П., Патяшина М.А., Пеньковская Н.А., Самойлова Л.В., Смирнов В.С., Степанова Т.Ф., Троценко О.Е., Тотолян А.А. Особенности формирования серопревалентности населения Российской Федерации к нуклеокапсиду SARS-CoV-2 в первую волну эпидемии COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 2. С. 297–323. [Popova A.Yu., Andreeva E.E., Babura E.A., Balakhonov S.V., Bashketova N.S., Bulanov M.V., Valeullina N.N., Goryaev D.V., Detkovskaya N.N., Ezhlova E.B., Zaitseva N.N., Istorik O.A., Kovalchuk I.V., Kozlovskikh D.N., Kombarova S.V., Kurganova O.P., Kutyrev V.V., Lomovtsev A.E., Lukicheva L.A., Lyalina L.V., Melnikova A.A., Mikailova O.M., Noskov A.K., Noskova L.N., Oglezneva E.E., Osmolovskay T.P., Patyashina M.A., Penkovskaya N.A., Samoilova L.V., Smirnov V.S., Stepanova T.F., Trotsenko O.E., Totolyan A.A. Features of developing SARS-CoV-2 nucleocapsid protein population-based seroprevalence during the first wave of the COVID-19 epidemic in the Russian Federation. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2021, vol. 11, no. 2, pp. 297–323. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-FOD-1684*
55. Попова А.Ю., Тотолян А.А. Методология оценки популяционного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 в условиях пандемии COVID-2019 // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 4. С. 609–616. [Popova A.Yu., Totolian A.A. Methodology for assessing herd immunity to the SARS-CoV-2 virus in the context of the COVID-19 pandemic. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2021, vol. 11, no. 4, pp. 609–616. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-MFA-1770*
56. Прошина Е. Вакцинация — не грех: в РПЦ обозначили позицию по прививкам от COVID // Рамблер. [Proshina E. Vaccination is not a sin: the ROC has designated a position on vaccinations against COVID. Rambler. *(In Russ.)*] 21.05.2020. *URL: https://news.rambler.ru/community/46462821-vaktsinatsiya-ne-greh-v-rpts-oboznachili-pozitsiyu-po-privivkam-ot-covid/*
57. Развитие эпидемиологической ситуации и процесс вакцинации против COVID-19 в период с 3 по 9 января 2022 г.: официальные данные Министерства Здравоохранения Республики Молдова // Правительство Республики Молдова [Сайт]. [Epidemiological situation development and COVID-19 vaccination process from January 3 till 9, 2022: official data of the Ministry of Health of the Republic of Moldova. Website of the Government of the Republic of Moldova]. *URL: https://vaccinare.gov.md/news/173-evolu-ia-situa-iei-epidemiologice-i-a-procesului-de-vaccinare-impotriva-covid-19-in-perioada-3-ianuarie-9-ianuarie-2022*
58. Совместное заявление Совета и Общества православных врачей России о проблемах вакцинации в России // РПЦ: официальный сайт Московского патриархата. [Joint statement of the Council and the Society of Orthodox Doctors of Russia on the problems of vaccination in Russia. *(In Russ.)*] 14.07.2009. *URL: http://www.patriarchia.ru/db/text/964218.html*
59. Создатели «Спутника V» ответили на запрос РПЦ о компонентах вакцины // Российская газета. [The creators of Sputnik V responded to the request of the ROC about the components of the vaccine. Russian Newspaper. *(In Russ.)*] 11.02.2021. *URL: https://rg.ru/2021/02/11/sozdateli-sputnika-v-otvetili-na-zapros-rpc-o-komponentah-vakciny.html*
60. Стратегия по борьбе с COVID-19 на 2021–2022 гг. [На азербайджанском] // Официальный сайт Кабинета министров Азербайджанской Республики. [Strategy to Combat COVID-19 for 2021–2022. Official website of the Cabinet of Ministers of the Republic of Azerbaijan. *(In Azerbaijanian)*] *URL: https://nk.gov.az/media/files/aacabbd711bceaf011679298e9eb8a89.pdf*
61. Суружиу В. Бизнес на прививках: в Молдове торгуют сертификатами о вакцинации // NOI.md. [Suruzhiu V. Vaccination business: certificates are traded in Moldova. NOI.md. *(In Russ.)*] 09.09.2021. *URL: https://noi.md/ru/analitika/biznes-na-privivkah-v-moldove-torguyut-sertifikatami-o-vakcinacii*
62. Узбекистан предпринимает экстренные меры по борьбе с коронавирусом // CentralAsia. [Uzbekistan is taking emergency measures to combat coronavirus. CentralAsia. *(In Russ.)*] 15.03.2020. *URL: https://centralasia.media/news:1603066*
63. Фальсификаторы сертификатов о вакцинации от COVID-19 // Ziarul de Gardă. [Falsifiers of vaccination certificates from COVID-19. Ziarul de Gardă. *(In Russ.)*] 20.09.2021. *URL: https://www.zdg.md/ru/?p=72834*
64. Фетва Совета Улемов Духовного собрания мусульман России по предотвращению распространения коронавирусной инфекции (COVID-19) (N 07/21-СУ от 15 июля 2021 года). [Fatwa of the Ulema Council of the Spiritual Assembly of Muslims of Russia on preventing the spread of coronavirus infection (COVID-19) N 07/21-SU dated July 15, 2021. *(In Russ.)*] *URL: https://dsmr.ru/islam/fetvy/2185-fetva-soveta-ulemov-dukhovnogo-sobraniya-musulman-rossii-po-predotvrashcheniyu-rasprostraneniya-koronavirusnoj-infektsii-covid-19.html*
65. Хохлов А.Л., Полозова Е.А., Комисарова В.А., Чудова Н.В., Цызман Л.Г. Риски, сопряженные с этическими аспектами проведения клинических исследований // Качественная клиническая практика. 2020. № 1. С. 61–68. [Khokhlov A.L., Polozova E.A., Komissarova V.A., Chudova N.V., Tsizman L.G. Risks associated with ethical aspects of clinical research. *Kachestvennaya klinicheskaya praktika = Qualitative Clinical Practice, 2020, no. 1, pp. 61–68. (In Russ.)*]
66. ЦАРЭС. Анализ отношения общества к вакцинации от COVID-19 в отдельных странах ЦАРЭС: аналитический отчет, апрель 2021. ЦАРЭС, 2021. 106 с. [CAREC. Analysis of society's attitude to vaccination against COVID-19 in selected CAREC countries: analytical report, April 2021. *CAREC, 2021. 106 p. (In Russ.)*]
67. Цифровые решения в вопросах вакцинации от COVID-19 // Минздрав Кыргызской Республики [Сайт]. [Digital solutions for COVID-19 vaccination. Ministry of Health of the Kyrgyz Republic [Website]. *(In Russ.)*] *URL: https://med.kg/vaccinationcovids/316*
68. Чучалин А.Г. Согласие. Современная трактовка: «Добровольное Информированное Согласие» // Терапевтический архив. 2021. Т. 93, № 5. С. 640–644. [Chuchalin A.G. Consent. Modern interpretation: "Voluntary Informed Consent". *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive, 2021, vol. 93, no. 5, pp. 640–644. (In Russ.)*]
69. Шакиров Ш. Вакцинация — самый эффективный способ обезопасить себя и окружающих // Национальная гвардия Республики Узбекистан. [Shakirov Sh. Vaccination is the most effective way to protect yourself and others. National Guard of the Republic of Uzbekistan. *(In Russ.)*] 15.05.2021. *URL: https://milliygvardiya.uz/ru/news/vaktsinatsija-samyj-effektivnyj-sposob-obezopasit-sebja-i-okruzhajuschih*
70. Этика вакцинации (критерий научного и гуманитарного прорыва) / Под ред. О.И. Кубарь. СПб.: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2018. 176 с. [Ethics of vaccination (criterion of scientific and humanitarian breakthrough). Ed. by O.I. Kubar. *St. Petersburg: St. Petersburg Pasteur Institute, 2018. 176 p. (In Russ.)*]

71. Этика инфекционной патологии / Под ред. О.И. Кубарь. СПб: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2014. 116 с. [Ethics of infectious pathology. Ed. by O.I. Kubar. *St. Petersburg: St. Petersburg Pasteur Institute, 2014. 116 p. (In Russ.)*]
72. Этическая экспертиза биомедицинских исследований в государствах — участниках СНГ (социальные и культурные аспекты) / Под ред. О.И. Кубарь., Г.Л. Микиртичан, А.Е. Никитиной. СПб.: Феникс, 2007. 408 с. [Ethical examination of biomedical research in the CIS member States (social and cultural aspects). Ed. by O.I. Kubar, G.L. Mikirtichan, A.E. Nikitina. *St. Petersburg: Phoenix, 2007. 408 p. (In Russ.)*]
73. ЮНИСЕФ поддерживает правительство Узбекистана в улучшении вакцинации по всей стране. ЮНИСЕФ передал Министерству здравоохранения Узбекистана 206 микроавтобусов и 17 рефрижераторов для улучшения мероприятий по вакцинации // UNICEF Узбекистан. [UNICEF is supporting the Government of Uzbekistan in improving vaccination across the country. UNICEF handed over 206 minivans and 17 refrigerated trucks to the Ministry of Health of Uzbekistan to improve vaccination activities. UNICEF Uzbekistan. *(In Russ.)*] 23.02.2021. *URL: https://www.unicef.org/uzbekistan/unicef-handed-over-vehicles-to-support-vaccination*
74. ЮНИСЕФ. Вакцинация против COVID-19 в Республике Молдова. [UNICEF. Vaccination against COVID-19 in the Republic of Moldova. *(In Russ.)*] *URL: https://www.unicef.org/moldova/ru/вакцинация-против-covid-19-в-республике-молдова*
75. COVID-19 и права человека // Human Rights Watch. [COVID-19 and human rights. Human Rights Watch. *(In Russ.)*] 01.04.2020. *URL: https://www.hrw.org/ru/news/2020/04/01/339654*
76. COVID-19 ограничения на путешествия: постановление Правительства Республики Армении N1514-Н от 11 сентября 2021 // Правительства Республики Армении [Сайт]. [COVID-19 travel restrictions: resolution of the Government of the Republic of Armenia N1514-N dated September 11, 2021. Government of the Republic of Armenia [Website]. *(In Russ.)*] *URL: https://www.gov.am/ru/covid-travel-restrictions*
77. Pelčić G., Karačić S., Микиртичан Г.Л., Кубарь О.И., Leavitt F. J., Cheng-tek Tai M., Morishita N., Vuletić S., Tomašević L. Религиозные возражения для вакцинации или религиозные оправдания для уклонения от вакцинации: действительно ли они существуют? // Медицина и организация здравоохранения. 2020. Т. 5, № 1. С. 58–78. [Pelčić G., Karačić S., Mikirtichan G.L., Kubar O.I., Leavitt F.J., Cheng-tek Tai M., Morishita N., Vuletić S., Tomašević L. Religious objections to vaccination or religious justifications to refuse vaccination: is it really true? *Meditsina i organizatsiya zdravookhraneniya = Medicine and Healthcare Organization, 2020, vol. 5, no. 1, pp. 58–78. (In Russ.)*]
78. Adams J.G., Walls R.M. Supporting the health care workforce during the COVID-19 global epidemic. *JAMA, 2020, vol. 323, no. 15, pp. 1439–1440. doi: 10.1001/jama.2020.3972*
79. CDC. Ethical Guidelines in Pandemic Influenza. Prep. by K. Kinlaw, R.J. Levine. February 15, 2007. *CDC, 2007. 12 p.*
80. CDC. Interim Considerations for Infection Prevention and Control of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in Inpatient Obstetric Healthcare Settings. February 18, 2020. *URL: https://stacks.cdc.gov/view/cdc/85196*
81. CDC. Stockpiling antivirals for pandemic influenza: the key ethical principles, prepared by ethics subcommittee of the advisory committee to the director. *November 28, 2007. 7 p.*
82. COE. COVID-19: Human rights principles must guide health decisions. April 14, 2020. *URL: https://www.coe.int/en/web/bioethics/-/covid-19-human-rights-principles-must-guide-health-decisio-1*
83. Congregation for the Doctrine of the Faith. Note on the morality of using some anti-Covid-19 vaccines. The Holy See. *URL: https://www.vatican.va/roman_curia/congregations/cfaith/documents/rc_con_cfaith_doc_20201221_nota-vaccini-anticovid_en.html*
84. Coronavirus (COVID-19) Vaccinations. Our World in Data. *URL: https://ourworldindata.org/covid-vaccinations?country=AZE*
85. EUCROF. Guidance on the Management of Clinical Trials during the COVID-19 (Coronavirus) pandemic. March 20, 2020. *URL: https://www.eucrof.eu/news-eucrof/latest-news/20-03-guidance-on-the-management-of-clinical-trials-during-the-covid-19-coronavirus-pandemic*
86. Eyal N. Why challenge trials of SARS-CoV-2 vaccines could be ethical despite risk of severe adverse events. *Ethics Hum. Res., 2020, vol. 42, no. 4, pp. 24–34. doi: 10.1002/eahr.500056*
87. Five privacy and ethical use principles for your COVID-19 response. Salesforce. 22.06.2020. *URL: https://www.salesforce.com/news/stories/five-privacy-and-ethical-use-principles-for-your-covid-19-response*
88. Gostin L.O., Hodge J.G. Jr. US Emergency legal responses to novel coronavirus: balancing public health and civil liberties. *JAMA, 2020, vol. 323, no. 12, pp. 1131–1132. doi: 10.1001/jama.2020.2025*
89. Kahna J.P., Henrya L.M., Mastroiannic A.C., Chene W.H., Macklinf R. For now, it's unethical to use human challenge studies for SARS-CoV-2 vaccine development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2020, vol. 117, no. 46, pp. 28538–28542. doi: 10.1073/pnas.2021189117*
90. Kubar O.I., Bichurina M.A., Romanenkova N.I. Ethical algorithm for evaluation the process of Infectious diseases eradication. *EC Microbiology, 2021, vol. 17, no. 11, pp. 11–12. doi: 10.19163/2070-1586-2020-2(26)-9-14*
91. Kubar O.I., Bichurina M.A., Romanenkova N.I. Ethical Consideration Regarding COVID-19. *EC Microbiology, 2020, si. 02, pp. 14–15.*
92. Manheim D., Więcek W., Schmit V., Morrison J.; 1Day Sooner Research Team. Exploring risks of human challenge trials for COVID-19. *medRxiv, 2020, vol. 41, no. 5, pp. 710–720. doi: 10.1111/risa.13726*
93. Moldova: reviewing a recommended approach with mandatory requirements for school attendance (Annex VII). In: Legislative Landscape Review: Legislative Approaches to Immunization Across the European Region. *Sabin Vaccine Institute, 2018, pp. 59–66.*
94. Pandemic Influenza Working Group. Stand on Guard for Thee. Ethical considerations in preparedness planning for pandemic influenza: a report of the University of Toronto Joint Centre for Bioethics. November 2005. *Pandemic Influenza Working Group, 2005. 29 p.*
95. Sándor J. Bioethics for the pandemic. May 8, 2020. Project Syndicate. *URL: https://www.project-syndicate.org/commentary/bioethics-principles-for-covid19-response-by-judit-sandor-2020-05*
96. Shah S.K., Miller F.G., Darton T.C., Duenas D., Emerson C., Lynch H.F., Jamrozik E., Jecker N.S., Kamuya D., Kapulu M., Kimmelman J., MacKay D., Memoli M.J., Murphy S.C., Palacios R., Richie T.L., Roestenberg M., Saxena A., Saylor K., Selgelid M.J., Vaswani V., Rid A. Ethics of controlled human infection to address COVID-19. *Science, 2020, vol. 368, no. 6493, pp. 832–834. doi: 10.1126/science.abc1076*
97. U.S. to make coronavirus strain for possible human challenge trials. 14 August 2020. Reuters. *URL: https://www.nbcnews.com/health/health-news/u-s-make-coronavirus-strain-possible-human-challenge-trials-n1236721*

98. UNESCO. Extraordinary Session of the IBC/Join Session of the IBC and IGBC/11th (Extraordinary) Session of COMEST, 23 and 24 February 2021. *URL: https://events.unesco.org/event?id=3007430391*
99. UNESCO. Statement on COVID-19: ethical considerations from global perspective 2020. SHS/IBC–COMEST/COVID-19 REV. *Paris, 6 April 2020. 4 p.*
100. Uzbekistan confirms first coronavirus case – govt. March 15, 2020. Reuters. *URL: https://www.reuters.com/article/health-coronavirus-uzbekistan-idUSL8N2B802F*
101. WHO. Addressing ethical issues in pandemic influenza planning: discussion papers. *Geneva: WHO, 2008. 113 p.*
102. WHO. Key criteria for the ethical acceptability of COVID-19 human challenge studies. May 6, 2020. *WHO, 2020. 119 p.*
103. World's first coronavirus human challenge study receives ethics approval in the UK. 17 February, 2021. Gov.UK. *URL: https://www.gov.uk/government/news/worlds-first-coronavirus-human-challenge-study-receives-ethics-approval-in-the-uk*

Авторы:
Кубарь О.И., д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории этиологии и контроля вирусных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия; член Российского комитета по биоэтике (РКБ) при Комиссии РФ по делам ЮНЕСКО МИД РФ, Москва, Россия; экс-член Международного комитета по биоэтике (МКБ) ЮНЕСКО;
Микиртичан Г.Л., д.м.н., профессор, зав. кафедрой гуманитарных дисциплин и биоэтики ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия;
Владимирова Е.Ю., к.э.н., секретарь Постоянной комиссии МПА СНГ по социальной политике и правам человека, ответственный секретарь Экспертного совета по здравоохранению МПА СНГ, Санкт-Петербург, Россия;
Таги-заде Т.Г., д.ф.н., доцент кафедры детских болезней-II (с курсом по медицинской биоэтике), Азербайджанский медицинский университет, Баку, Азербайджан;
Мамедова Ф.М., д.ф.н., доцент кафедры детских болезней-II (с курсом по медицинской биоэтике), Азербайджанский медицинский университет, Баку, Азербайджан;
Гаджиева У.К., д.ф.н., доцент кафедры детских болезней-II (с курсом по медицинской биоэтике), Азербайджанский медицинский университет, Баку, Азербайджан;
Давтян С.А., д.ф.н., доцент кафедры общественных дисциплин Ереванского государственного медицинского университета им. М. Гераци, Ереван, Армения;
Мавсисян Ф.М., сотрудник кафедры эпидемиологии Ереванского государственного медицинского университета им. М. Гераци, Ереван, Армения;
Тилекеева У.М., д.м.н., профессор, зав. кафедрой базисной и клинической фармакологии Кыргызской государственной медицинской академии им. И.К. Ахунбаева, Бишкек, Кыргызстан;
Грамма Р.К., к.ф.н., магистр биоэтики, магистр права и управления в здравоохранении, доцент кафедры судебной медицины Государственного медицинского и фармацевтического университета им. Николая Тестемицану, Кишенев, Молдова;
Насырова Ф.Ю., д.б.н. профессор, зав. лабораторией биобезопасности ИБФиГР НАНТ, зам. председателя Совета по биоэтике при НАНТ, вице-президент Азиатской ассоциации по биоэтике, Душанбе, Таджикистан;
Тишкова Ф.Х., д.б.н., профессор, зав. вирусологической лабораторией Таджикского НИИ профилактической медицины, Душанбе, Таджикистан;
Мухамедова З.М., д.ф.н., профессор кафедры социогуманитарных наук с курсом биоэтики Ташкентского государственного стоматологического института, Ташкент, Узбекистан;
Атамурадова Ф.С., к.ф.н., доцент кафедры социальных наук Ташкентской медицинской академии, Ташкент, Узбекистан.

Authors:
Kubar O.I., PhD, MD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Etiology and Control of Viral Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Member of the Russian Committee on Bioethics (RCB) at the Russian Federation Commission for UNESCO of the Ministry of Foreign Affairs of the Russian Federation, Moscow, Russia; ex-member of the International Committee on Bioethics (IBC) UNESCO;
Mikirtichan G.L., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Humanitarian Disciplines and Bioethics, St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;
Vladimirova E.Yu., PhD (Ecology), Secretary of the IPA CIS Permanent Commission on Social Policy and Human Rights, IPA CIS Executive Secretary of the IPA CIS Health Expert Council, St. Petersburg, Russian Federation;
Taghi-zade T.G., PhD, MD (Philology), Associate Professor, Department of Children's Diseases-II (with a course in medical bioethics), Azerbaijan Medical University, Baku, Azerbaijan;
Mamedova F.M., PhD, MD (Philosophy), Associate Professor, Department of Children's Diseases-II (with a course in medical bioethics), Azerbaijan Medical University, Baku, Azerbaijan;
Gadzhieva U.K., PhD, MD (Philology), Associate Professor, Department of Children's Diseases-II (with a course in medical bioethics), Azerbaijan Medical University, Baku, Azerbaijan;
Davtyan S.A., PhD, MD (Pharmacy), Associate Professor, Department of Social Disciplines, Yerevan State Medical University named after M. Heratsi, Yerevan, Armenia;
Mavsisyan F.M., Employee of the Department of Epidemiology, Yerevan State Medical University named after M. Heratsi, Yerevan, Armenia;
Tilekeeva U.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Basic and Clinical Pharmacology, Kyrgyz State Medical Academy named after I.K. Akhunbaev, Bishkek, Kyrgyzstan;
Gramma R.K., PhD (Pharmacy), Master in Bioethics, Master of Law and Management in Healthcare, Associate Professor, Department of Forensic Medicine, Nicolae Testemiţanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Moldova;
Nasyrova F.Yu., PhD, MD (Biology), Professor, Head of the Biosafety Laboratory of the Institute of Biosafety and GR of NAST, Deputy Chairman of the Bioethics Council at NAST, Vice President of the Asian Association for Bioethics, Dushanbe, Tajikistan;
Tishkova F.H., PhD, MD (Biology), Professor, Head of the Virological Laboratory, Tajik Research Institute of Preventive Medicine, Dushanbe, Tajikistan;
Muhamedova Z.M., PhD, MD (Pharmacy), Professor, Department of Social and Humanitarian Sciences with the Course of Bioethics, Tashkent State Dental Institute, Tashkent, Uzbekistan;
Atamuradova F.S., PhD (Pharmacy), Associate Professor, Department of Social Sciences, Tashkent Medical Academy, Tashkent, Uzbekistan.

Поступила в редакцию 04.02.2022
Принята к печати 19.02.2022

Received 04.02.2022
Accepted 19.02.2022

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2022, vol. 12, no. 2, pp. 239–252

Инфекция и иммунитет
2022, Т. 12, № 2, с. 239–252

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ КЛИНИЧЕСКОЙ КАРТИНЫ И ДИАГНОСТИКИ СЕПТИЧЕСКОГО ШОКА

Л.И. Гоманова, М.А. Фокина

ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Резюме. Септический шок на сегодняшний день остается до конца нерешенной проблемой здравоохранения, которая приводит к серьезным эпидемиологическим, экономическим и социальным сложностям. Септический шок является общим гемодинамическим расстройством, вызванным взаимодействием патогенных микроорганизмов с клетками организма и ведущим к развитию циркуляторной гипоксии, тяжелым метаболическим расстройствам и полиорганной недостаточности. На сегодняшний день не существует единой концепции патофизиологии септического шока. Однако существующие данные доказывают, что одним из ключевых звеньев в патогенезе септического шока является дисфункция эндотелия и связанные с ней ишемические расстройства. В клиническом течении септического шока выделяют три стадии: стадию компенсации, декомпенсации и необратимых нарушений. Начальная стадия, или стадия компенсации, характеризуется активацией воспалительной реакции в ответ на действие инфекционного агента. Клинически данная стадия характеризуется развитием «теплого» шока: лихорадки, гиперемии кожных покровов, гипервентиляции, увеличения сердечного выброса, тахикардии. Вторая стадия в развитии септического шока характеризуется развитием «холодного» шока, что является следствием нарастания сердечной и дыхательной недостаточности. Конечной стадией является развитие полиорганной недостаточности, которая проявляется в формировании «шоковых» органов. Синдром полиорганной недостаточности возникает в результате микротромбоза и нарастающей ишемии, что приводит к гипоксии и развитию митохондриальной дисфункции иммунокомпетентных клеток. Для пациентов на данной стадии характерны прогрессия цианоза, развитие анурии и кишечной непроходимости, изменение психического статуса. Перспективным направлением изучения септического шока является его лабораторная и инструментальная диагностика. Уровни С-реактивного белка, лактата, провоспалительных цитокинов в крови не являются высокоспецифичными диагностическими показателями септического шока, поскольку могут наблюдаться при любом воспалительном процессе. Перспективными диагностическими маркерами являются уровень пентраксина-3, концентрация липопротеинов высокой плотности и фосфатидилхолина в крови. Оценить тяжесть течения септического шока позволяет определение количества шистоцитов в крови, показатель центрального венозного давления и соотношение уровня венозно-артериального CO_2 и артериально-венозного O_2. Определить формирующуюся полиорганную недостаточность позволяют следующие диагностические методы: оценка проэнкефалина A119–159 и гепарин-связывающего белка; эхокардиография, измерение концентрации тропонинов I и натрийуретических пептидов N-концевого pro-b-типа; оценка активности ренин-ангиотензин-

Адрес для переписки:
Гоманова Лилия Ильинична
119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, 8/2,
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
Минздрава России (Сеченовский Университет).
Тел.: 8 (919) 109-95-90.
E-mail: gomanova_liliya@mail.ru

Contacts:
Liliya I. Gomanova
119991, Russian Federation, Moscow, Trubetskaya str., 8/2,
I.M. Sechenov First Moscow State Medical University.
Phone: +7 (919) 109-95-90.
E-mail: gomanova_liliya@mail.ru

Для цитирования:
Гоманова Л.И., Фокина М.А. Актуальные вопросы клинической картины и диагностики септического шока // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 2. С. 239–252. doi: 10.15789/2220-7619-TIO-1811

Citation:
Gomanova L.I., Fokina M.A. Topical issues of clinical symptoms and diagnostics of septic shock // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 2, pp. 239–252. doi: 10.15789/2220-7619-TIO-1811

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-TIO-1811

альдостероновой системы. В статье рассмотрены ключевые аспекты патогенеза, особенности клинической картины и морфологических изменений в ходе септического шока. Изучены перспективные методы диагностики заболевания и его осложнений.

Ключевые слова: *септический шок, патогенез, клинические симптомы, морфология, синдром полиорганной недостаточности, «шоковые» органы, диагностика.*

TOPICAL ISSUES OF CLINICAL SYMPTOMS AND DIAGNOSTICS OF SEPTIC SHOCK

Gomanova L.I., Fokina M.A.

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Currently, septic shock remains an unresolved public health problem that leads to serious epidemiological, economic and social problems. Septic shock is a common hemodynamic disorder caused by the interaction between pathogenic microbes and host cells, resulting in developing hypoxia, severe metabolic disorders and multiple organ failure. By now, no unified concept for pathophysiology of septic shock are available. However, the aforementioned data prove that one of the key arms in the pathogenesis is endothelial dysfunction and associated ischemic disorders. In the clinical course of septic shock, three stages are distinguished: the stage of compensation, decompensation as well as the stage of irreversible disorders. The initial stage, or the stage of compensation, is characterized by the activated inflammatory response against infectious agents. Clinically, this stage is characterized by the development of "warm shock": fever, dermal hyperemia, hyperventilation, increased cardiac output, and tachycardia. The second stage in developing septic shock is characterized by arising "cold shock" as a consequence of escalating heart and respiratory failure. The final stage is the development of multiple organ failure manifested by emerging "shock" organs. Multiple organ failure occurs due to microthrombosis and increasing ischemia, which leads to hypoxia and development of mitochondrial dysfunction in immune cells. At this stage patients are characterized by the progressive cyanosis, developing anuria and intestinal obstruction, as well as altered mental status. Laboratory and instrumental diagnostics of septic shock is a promising approach to examine septic shock. The level of serum C-reactive protein, lactate, and proinflammatory cytokines are not highly specific diagnostic parameters of septic shock, because they can be found in any inflammatory process. Today, the promising diagnostic markers are pentraxin-3, high-density lipoproteins, and phosphatidylcholine. The severity of septic shock can be assessed by determining blood schistocytes, central venous pressure, and the ratio of venous-arterial CO_2 and arterial-venous O_2 pressure. The following diagnostic methods can be used to determine multiple organ failure: level of serum proenkephalin A119–159 and heparin-binding protein; echocardiography, troponin I concentration and N-terminal pro-b-type natriuretic peptides; measuring activity of the renin-angiotensin-aldosterone system. Here we discuss the key aspects of pathogenesis, clinical picture and morphological changes of septic shock. The promising methods for diagnosing the disease and its complications have been studied.

Key words: *septic shock, pathogenesis, clinical symptoms, morphology, multiple organ failure syndrome, "shock" organs, diagnosis.*

Введение

Септический шок — это разновидность сепсиса, при котором отмечаются значительные циркуляторные и метаболические расстройства, затрагивающие не только органный, но и клеточный уровень, характеризующиеся повышенным риском развития летального исхода у пациента по сравнению с сепсисом. Важными отличиями септического шока являются развитие стойкой артериальной гипотензии, требующей назначение вазопрессорной терапии для достижения артериального давления выше 65 мм рт.ст., и наличие лактата в сыворотке крови выше 2 ммоль/л (по результатам международного консенсуса Sepsis-3) [59]. Причины развития сепсиса разнообразны: наличие инфекционного очага бактериальной, вирусной, фунгальной, протозойной этиологии и др. При отсутствии своевременной диагностики сепсиса и его лечения, он способен вызвать септический шок, который в дальнейшем приведет к полиорганной недостаточности и летальному исходу [24]. По данным ВОЗ ежегодное число случаев септического шока в мире составляет 24 млн. По результатам современных исследований смертность от септического шока в Европе, США и Канаде составляет 38–53%, а число ежегодных госпитализаций с данным заболеванием составляет около 11% [10]. Отдельной глобальной проблемой является септический шок в педиатрической практике. Последние исследования показали, что распространенность септического шока среди детей в клиниках по всему миру составляет от 2,2 до 15,4%, что представляет собой реальную угрозу [25, 65]. Хронические заболевания, тяжелые травмы, иммуносупрессия, социально-демографические показатели (мужской пол, возраст старше 65 лет и др.) являются факторами риска развития сепсиса и септического шока [35, 55]. Многоцентровое двенадцатилетнее (1997–2008) исследование B. Zuber и соавт. показало, что выживаемость больных септическим шоком со злокачественными новообразо-

ваниями заметно возросла за последние годы (с 29,6 до 47,5%), однако опухолевые заболевания остаются предикторами ранней смертности для пациентов с септическим шоком [75].

Патофизиология септического шока

Септический шок включает в себя активацию иммунных и неиммунных механизмов защиты организма. Особенностью септического шока в отличие от сепсиса является повреждение эндотелия сосудов под действием инфекционных агентов или окислительного стресса. В дальнейшем через ряд промежуточных реакций развивается ишемия жизненно важных органов и тканей, ДВС-синдром, снижение артериального давления [53]. Причинами развития септического шока могут являться разнообразные инфекционные агенты. Отдельной проблемой на сегодняшний день является септический шок фунгальной этиологии. Многочисленные исследования показывают, что генерализованная форма кандидозной инфекции (кандидемия) в большинстве случаев осложняется развитием септического шока, что приводит к увеличению смертности среди таких пациентов [28]. Исследование M. Bassetti и соавт. продемонстрировало, что среди пациентов с кандидемией (n = 317) (*Candida* spp.) септический шок развился у 31,2% (n = 99) больных [8]. K. Ng и соавт. в исследовании 2003–2011 гг. показали, что среди 16 074 пациентов ОРИТ (Нью-Джерси, США) был отмечен 161 случай кандидемии (n = 158). Среди этих пациентов у 40% был установлен септический шок [50]. Другое исследование 2012–2014 гг. M. Falcone и соавт. продемонстрировало, что среди пациентов с кандидемией (n = 439) септический шок развился у 39,2% (n = 172) больных [22]. Можно сделать вывод, что наличие генерализованной формы кандидозной инфекции является фактором риска развития септического шока. У каждого четвертого пациента с кандидемией может развиться септический шок. Госпитальная смертность при таком септическом шоке может достигать 87% [29].

Если говорить о патогенезе септического шока, то в его развитии можно выделить несколько синдромов: воспалительный, тромбоцитопенический, синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания, синдром микро-/макроциркуляторных расстройств, синдром полиорганной недостаточности [11]. Любой шок, определяемый на клеточном уровне, представляет собой состояние, при котором доставка кислорода к клеткам недостаточна для поддержания клеточной активности и нормальной функций органов. Одним из направлений терапии «шоковых» пациентов является нормализация системных гемодинамических расстройств, которая приводит к одновременному улучшению перфузии органов и восстановлению оксигенации тканей. При септическом шоке макроциркуляторные и микроциркуляторные нарушения одновременно участвуют в формировании полиорганной недостаточности. Особенностью септического шока является отсутствие восстановления функций микроциркуляторного русла несмотря на нормализацию гемодинамических показателей. Исследования P.R. Mouncey и соавт. показали, что инфузионная терапия с достижением целевых значений гемодинамики не повышала выживаемость среди пациентов с септическим шоком [43, 49].

На сегодняшний день не существует единой концепции патофизиологии септического шока. Однако вышеприведенные данные доказывают, что одним из ключевых звеньев в патогенезе септического шока является дисфункция эндотелия и связанные с ней ишемические расстройства. Сейчас предложена теория эндотелиопатии, которая приводит к развитию двух синдромов: воспалительного и микротромботического [17, 18]. Воспалительный путь с активацией рецепторов антигенпрезентирующих клеток, активацией системы комплемента и синтезом воспалительных цитокинов увеличивает экспрессию селектинов и молекул адгезии. Активация антигенпрезентирующих клеток включает активацию моноцитов, макрофагов, дендритных клеток и эндотелиальных клеток. Данные клетки отвечают за активацию сигнальных путей среди иммунных клеток с целью высвобождения медиаторов воспаления IL-1, IL-6, IL-8, TNFα и дальнейшего усиления воспалительного ответа. Провоспалительная передача сигналов усиливает сосудистую эндотелиальную дисфункцию и впоследствии способствует притоку большего количества воспалительных клеток, таких как нейтрофилы, моноциты, макрофаги и лимфоциты, и формирует порочный провоспалительный круг [33]. Данный процесс изменяет экспрессию прокоагулянтных и антикоагулянтных белков, что увеличивает проницаемость сосудов и приводит к потере внутрисосудистой жидкости. На данном этапе эндотелий переходит в прокоагулянтное состояние, что усиливает экстравазацию воспалительных клеток через разрушенный эндотелий и активирует коагуляционный каскад: поврежденный эндотелий активирует фактор фон Виллебранда, что через ряд промежуточных стадий (активация агрегации тромбоцитов и образования фибрина, активация тромбоцитов, усиление коагуляции) приводит к прогрессированию воспаления и образованию микротромбов [16]. До сих пор остается невыясненным, каким образом цир-

куляторная гипоксия и ДВС-синдром во время воспаления способны вызвать стойкую гипотензию и привести к шоку. На сегодняшний день современные исследования показывают, что одной из возможных прямых причин стойкого снижения артериального давления в ходе септического шока является кровоизлияние в надпочечниках. Предполагают, что ряд микроорганизмов, вызывающих септический шок (например, *Neisseria meningitidis* и др.), имеют тропизм к клеткам надпочечников. В свою очередь иммуновоспалительные реакции с вовлечением эндотелия сосудов надпочечников вызывают образование микротромбов, что приводит к тромбоцитопеническому синдрому, а затем и к ДВС-синдрому. Развиваются необратимые ишемические изменения в паренхиме надпочечников, геморрагии, что в конечном итоге приводит к некрозу клеток. Клинически данное состояние рассматривается как острая надпочечниковая недостаточность [7].

Необходимо отметить, что септический шок, вызванный *Neisseria meningitidis*, является наиболее тяжелым из-за быстрой прогрессии клинических симптомов и раннего развития полиорганной недостаточности [12, 20]. Для такого септического шока характерен наиболее выраженный дисбаланс между свертывающей и фибринолитической системами крови. Присутствие менингококкового эндотоксина в крови вызывает тяжелую острую провоспалительную реакцию. Цитокины стимулируют высвобождение тканевых факторов, что приводит к образованию тромбина и фибриновых сгустков. Цитокины и тромбин ингибируют тканевой активатор плазминогена, высвобождая ингибитор активатора плазминогена 1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1 — PAI-1), нарушая фибринолитический путь. Образование тромбина стимулирует воспалительные процессы и дополнительно ослабляет фибринолитическую систему за счет активации ингибитора фибринолиза (Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor — TAFI). Активация эндотоксинового комплемента (в основном через альтернативные пути и пути связывания маннозы) приводит к накоплению анафилотоксинов, таких как C3a и C5a, которые вызывают повреждение эндотелия. Микротромбоз и эндотелиальная дисфункция, связанные с провоспалительным ответом, снижают эндотелиальную экспрессию тромбомодулина и рецепторов эндотелиального протеина С, тем самым снижая и фибринолиз. Прокоагулянтное и провоспалительное состояние, связанное с этими изменениями, вызывает эндоваскулярное повреждение, микроваскулярный тромбоз, ишемию органов и в конечном итоге — полиорганную недостаточность [12]. Результаты исследования B.S. Brusletto и соавт., направленного на оценку экспрессии различных молекул органами при менингококковом септическом шоке, показали, что острая сердечная, легочная и почечная недостаточность при септическом шоке связаны с активацией воспаления через пути EIF2 (Eukaryotic Initiation Factor 2), TREM1 (Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 1), IL-6, HMGB1 (High-Mobility Group Box 1), сигналы PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors) и активацию LXR/RXR рецепторов (Liver X Receptor/Retinoid X Receptor). Меньшее количество генов регулируется в печени и селезенке. Основными регуляторами развития полиорганной недостаточности являются TNFα, IL-1β, IL-6, RICTOR (Rapamycin-Insensitive Companion of Mammalian Target of Rapamycin — RICTOR), miR-6739-3p и CD3. Повышенное количество воспалительных клеток ($CD68^+$, $CD3^+$ и $CD20^+$) было обнаружено в легких и сердце [12].

Особенности клинической картины септического шока

В клиническом течении септического шока выделяют три стадии: стадия компенсации, стадия декомпенсации и стадия необратимых нарушений (стадия формирования «шоковых» органов). Начальная стадия, или стадия компенсации, характеризуется активацией воспалительной реакции в ответ на действие инфекционного агента (грамотрицательных, грамположительных бактерий, грибов, простейших, паразитов, вирусов). Повышенное высвобождение провоспалительных цитокинов как следствие активации нейтрофилов, макрофагов и лимфоцитов приводит к повышению активности синтазы оксида азота (NO) в эндотелиальных клетках сосудов. Оксид азота оказывает вазодилатирующий эффект, что проявляется на данном этапе снижением общего периферического сопротивления сосудов (ОПСС) и компенсаторным ростом минутного объема кровотока (МОК). При воспалительной реакции в ответ на миграцию и адгезию иммунных клеток эндотелиальные клетки начинают высвобождать медиаторы воспаления. Иммунные клетки начинают экспрессировать активные формы кислорода (супероксид-анион, перекись водорода, гидроксильный радикал, гидроперекисный радикал), что приводит к перекисному окислению липидов эндотелильных клеток. Нарушение антиоксидантной системы приводит к разрушению мембраны клетки, повреждению молекул ДНК и инициации апоптоза. Также высвобождение активных форм кислорода может приводить к дополнительной экспрессии эндотелиальными клетками цитокинов, хемокинов и молекул адгезии лейкоцитов,

что многократно увеличивает реакции воспаления [1]. Данный механизм приводит к повышению протеазной активности, что впоследствии выражается в разрушении клеток и развитии эндотелиальной дисфункции. Наблюдается выход внутрисосудистой жидкости в межклеточное пространство, что приводит к снижению объема циркулирующей крови (ОЦК).

Наряду с формированием эндотелиальной дисфункции одним из ключевых звеньев развития патологических процессов в органах и тканях при септическом шоке является нарушение тканевого дыхания. Длительное воспаление у пациентов с септическим шоком вызывает снижение митохондриальной активности, что проявляется дисфункцией электронной транспортной цепи в митохондриях и развитием тканевой гипоксии. Стойкое снижение ОПСС, увеличение МОК, повышение частоты сердечных сокращений (ЧСС) приводит к развитию циркуляторной гипоксии, проявляющейся в росте артериовенозной разницы по кислороду. Это дополнительно усугубляет течение тканевой гипоксии, вызывает переход клетки на анаэробный путь окисления и приводит к формированию лактат-ацидоза [4].

Наблюдающаяся в этот момент активация системы свертывания крови, брадикининовой системы, фибринолитической системы и системы комплемента приводит к развитию ДВС-синдрома, который характеризуется сменой фаз гиперкоагуляции и коагулопатии потребления, развитием микротромбов, микроангиопатии [2]. В конечном итоге нарастает ишемия тканей и органов, которая приводит к гипоперфузии жизненно важных органов и тканей. Выраженность ДВС-синдрома и тромботической микроангиопатии при септическом шоке является определяющим фактором тяжести состояния и предиктором летального исхода [3]. В первую очередь ишемии подвержены миокард и почки, что морфологически рассматривается как формирование так называемых «шоковых» органов [46]. Клинически данная стадия септического шока характеризуется развитием «теплого» шока: лихорадки, гиперемии кожных покровов, гипервентиляции. Снижение ОПСС приводит к компенсаторному росту сердечного выброса. На данном этапе у пациентов развивается тахикардия [46].

Вторая стадия в развитии септического шока, или стадия декомпенсации, характеризуется развитием «холодного» шока, что является следствием нарастания сердечной недостаточности. На данной стадии развивается стойкая артериальная гипертензия, резистентная к проводимой инфузионной терапии. Вследствие уменьшения притока крови к сердцу нарастает гипоперфузия. Компенсаторно для того, чтобы обеспечить кровоснабжением жизненно важные органы, активизируется симпатическая вегетативная нервная система, что клинически проявляется в увеличении общего периферического сопротивления сосудов и еще большем нарастании тахикардии. В целях экономии кровенаполнения миокарда сужаются коронарные сосуды, что уменьшает сердечный выброс. Нарастает одышка, наступает цианоз кожных покровов, ощущается нитевидный пульс, что является следствием прогрессирующей сердечной и дыхательной недостаточности. Сужение периферических сосудов является адаптивной реакцией организма в целях централизации кровообращения, что клинически проявляется развитием «белой» гипертермии [18, 46].

Конечной стадией в клиническом течении септического шока является развитие полиорганной недостаточности, которая проявляется в формировании «шоковых» органов. Для пациентов на данной стадии характерны прогрессия цианоза, развитие анурии и кишечной непроходимости, изменение психического состояния, иногда наступление комы [46].

Развитие полиорганной недостаточности при септическом шоке

Несколько десятилетий назад ученые утверждали, что патофизиологический механизм недостаточности функции органов являлся результатом прямой инвазии патогена в ткани органов. Современные же исследования все чаще доказывают, что синдром полиорганной недостаточности возникает в результате микротромбоза и нарастающей ишемии, что приводит к гипоксии и развитию митохондриальной дисфункции иммунокомпетентных клеток, в частности лимфоцитов [32, 45]. Так, исследование В.С. Чирского и соавт. показало, что при септическом шоке более выражена активация свертывающей системы крови, что приводит к более частому формированию тромбов микроциркуляторного русла. Авторы отмечают, что для септического шока характерно более тяжелое поражение сосудов, развитие лейкоцитарных стазов, сладж-феномена, тромбов в сосудах миокарда и гиалиновых мембран в легких [5].

Синдром полиорганной недостаточности при септическом шоке, включая острую почечную, печеночную, сердечную, дыхательную недостаточности, острый некротический панкреатит, острую недостаточность надпочечников и другие состояния, может быть обратимым, если не развивается некротическое изменение в данных органах. Это открывает путь к пониманию терапии, направленной на изменение соотно-

шения коагулянтных и антикоагулянтных факторов крови пациентов, а также на восстановление активности иммунных клеток.

Как уже упоминалось, патофизиология септического шока является сложным процессом и включает вазодилатацию, относительную и абсолютную гиповолемию, изменения макро-/микрососудистого кровотока и в конечном итоге дисфункцию миокарда. Современные исследования показали, что сердечная недостаточность при септическом шоке формируется исходя из нескольких механизмов. После распознавания инфекционных агентов с помощью Toll-like receptors (TLRs) иммунных клеток кардиомиоциты экспрессируют высокие уровни молекул межклеточной адгезии 1 (Intercellular Adhesion Molecule 1 — ICAM-1). ICAM-1 взаимодействуют с воспалительными клетками и внеклеточным матриксом, а затем с актиновыми нитями кардиомиоцитов, что приводит к снижению их сократительной активности [5, 56]. В исследовании M. Samannodi и соавт. было показано, что острая печеночная, почечная и дыхательная недостаточность почти всегда осложняют течение септического шока [57].

Если говорить о патологии печени, A.M. Garofalo и соавт. выделили несколько наиболее распространенных состояний, вызываемых сепсисом и септическим шоком: портальное воспаление, центролобулярный некроз, лобулярное воспаление, гепатоцеллюлярный апоптоз, холангит, холангиолит, канальцевый холестаз и протоковый холестаз. По данным литературы одним из неблагоприятных состояний при септическом шоке является прогрессирующий склерозирующий холангит. При данной патологии наблюдаются множественные стенозы канальцев с предстенотической дилатацией, а также некротические массы, заполняющие желчные протоки. Центролобулярный геморрагический некроз печени часто встречается при недостаточности периферического кровообращения. Действие инфекционных агентов, массивное высвобождение медиаторов воспаления, гипоксия, приводящая к нарушению клеточного метаболизма, нарастающая ишемия — факторы, которые приводят к прогрессии апоптоза печени, внутрипеченочного холестаза и стеатоза [27]. Клинический случай, описанный V. Inthasot и соавт., продемонстрировал, что у 83-летнего пациента с гепатитом, вызванным вирусом простого герпеса, течение заболевания осложнилось септическим шоком. В основе повреждения печени лежал ДВС-синдром и гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз. У пациента наблюдалась также острая почечная недостаточность совместно с энцефалопатическим синдромом [34].

В основе развития острой почечной недостаточности (ОПН) лежат механизмы как нарушения микроциркуляторной перфузии, так и нарушения клеточной активности. Провоспалительные цитокины, высвобождаемые во время септического шока, фильтруются в клубочках, проникают в проксимальные канальцы и могут непосредственно активировать эпителиальные клетки канальцев, что приводит к изменению метаболического и функционального состояния этих клеток. Повышенная проницаемость сосудов приводит к интерстициальному отеку и задержке жидкости. Поскольку почка представляет собой инкапсулированный орган, скопление жидкости и отек ткани способствуют ухудшению почечной микроциркуляторной перфузии, изменяя трансмуральное давление и усугубляя венозный застой. Дисбаланс между вазоконстрикторами, вазодилататорами и окислительным стрессом на эндотелиальном уровне является одним из основных факторов развития ОПН. Усиленная вазоконстрикция, окклюзия мелких сосудов из-за реакции лейкоцитов с активированными эндотелиальными клетками и активация системы свертывания крови приводят к локальному нарушению микроциркуляции и местной ишемии [73]. N. Lerolle и соавт. при исследовании 19 пациентов, умерших от септического шока, показали, что клубочковые капилляры и канальцы почек были инфильтрированы моноцитами и макрофагами. Отложение фибрина наблюдалось только у 8 пациентов, а тромбы гломерулярных капилляров были обнаружены лишь у одного пациента. В проксимальных и дистальных канальцах у всех пациентов были отмечены изменения, связанные с острым повреждением, а именно выраженный некроз, уплощение цитоплазмы и появление апоптотических телец [40].

Дыхательная недостаточность, осложняющая течение септического шока, характеризуется развитием острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС). ОРДС также является одним из этапов процесса развития полиорганной недостаточности, характеризуется формированием повышенной проницаемости эпителиальных и эндотелиальных клеток капилляров легких, притоком большого количества альвеолярных макрофагов с нейтрофилами и апоптозом клеток. Тяжелые воспалительные реакции, вызванные септическим шоком и/или сепсисом, приводят к острому отеку легких за счет изменения проницаемости сосудов, что составляет экссудативную фазу ОРДС. Диффузное альвеолярное поражение считается гистологическим признаком острой фазы ОРДС. Из-за повреждения альвеолярного эпителия и накопления свободной жидкости способность легких к кислородному обмену снижается, что проявляется в формировании острой дыхательной недостаточности [33].

Другим серьезным осложнением в ходе септического шока может быть повреждение головного мозга, которое чаще проявляется в виде инсультов, энцефалитов и других энцефалопатий. Исследования D. Sanz и соавт., H. Yamaguchi и соавт. показали, что причиной повреждения клеток головного мозга при септическом шоке является активация воспалительного процесса в сочетании с нарушением кровообращения. Патогенез включает в себя взаимодействие нескольких механизмов: клетки, выстилающие гематоэнцефалический барьер, видоизменяются под влиянием активации эндотелиальных клеток церебральных сосудов в ответ на высвобождение медиаторов воспаления. Результатом является активация микроглиальных клеток, которые в свою очередь высвобождают оксид азота, цитокины и реактивные формы кислорода. В конечном итоге это приводит к гибели клеток подверженных риску областей головного мозга, что проявляется в нем нейродегенеративными и ишемическими процессами [58, 68].

Многообразие клинических проявлений септического шока не позволяет систематизировать симптомы, что затрудняет распознавание данного осложнения практикующим врачом. B. Gardlund и соавт. впервые определили 6 фенотипов септического шока у пациентов [26]:

1. неосложненный септический шок;
2. пневмония с респираторным дистресс-синдромом (РДС) у взрослых;
3. септический шок вследствие операции на брюшной полости;
4. тяжелый септический шок;
5. пневмония с РДС и синдромом полиорганной недостаточности;
6. поздний септический шок.

Такая классификация септического шока определяет возможные стратегии терапии пациентов и помогает врачам избежать ошибок в диагностике.

Диагностика септического шока и полиорганной недостаточности

В 2016 г. целевой группой Общества реаниматологии/Европейского общества интенсивной терапии на Международном консенсусе Sepsis-3 были обновлены критерии сепсиса, септического шока и полиорганной недостаточности. Была усовершенствована шкала оценки сепсиса и септического шока — qSOFA (Quick Sepsis-related Organ Failure Assessment). Данная шкала быстрой оценки сепсис-индуцированной полиорганной недостаточности применима для выявления сепсиса и/или септического шока. Она включает в себя определение измененного психического состояния, систолического артериального давления (САД) более 100 мм рт.ст., частоты дыхательных движений (ЧДД) более 22/мин. Септический шок будет определяться на основе данной шкалы с регистрацией сохраняющейся гипотонии, резистентной к проводимой инфузионной терапии, необходимости введения вазопрессоров для поддержания САД ≥ 65 мм рт.ст. и уровня лактата в крови более 2 ммоль/л (18 мг/дл). Определение САД и уровня лактата в крови позволяют быстро, у постели пациента, выявить формирование септического шока и начать проведение терапии. Если говорить о лабораторных методах диагностики септического шока, то на сегодняшний день не существует золотого стандарта его диагностики и прогнозирования. Развитие неспецифических признаков и симптомов затрудняет раннюю диагностику септического шока, что повышает риск развития полиорганной недостаточности в условиях отсутствия назначения своевременного лечения [59, 71]. Исследования B. Yang и соавт. показали, что возраст пациента, частота сердечных сокращений, концентрация миоглобина, время от госпитализации до развития септического шока, продолжительность искусственной вентиляции легких являются независимыми факторами риска для прогноза пациентов с септическим шоком [70]. На сегодняшний день не существует окончательных диагностических критериев септического шока, они постоянно пересматриваются и видоизменяются. Вышеуказанная гиперлактатемия не является высокоспецифичным маркером септического шока, поскольку может наблюдаться при воспалении, травме, ишемическом расстройстве, то есть при любом состоянии, сопровождающем анаэробный метаболизм [21, 23]. Необходимо отметить, что исследователи приходят к выводу, что для объективной диагностики септического шока и оценки прогноза пациента важно использовать не однократное измерение уровня лактата в крови, а серийное измерение и/или клиренс лактата. S.G. Lee и соавт. в исследовании показали, что 6-часовой уровень лактата имеет лучшую прогностическую ценность, чем исходный уровень лактата и его клиренс [38]. Оценка уровня провоспалительных цитокинов также не является специфичным методом диагностики септического шока. Например, цитокин IL-8 по результатам исследований C.S. Calfee и соавт. имеет превосходную 90–95% прогностическую ценность в отношении смерти через 28 дней у детей с септическим шоком. Однако по отношению ко взрослым пациентам (> 18 лет) с септическим шоком IL-8 не является чувствительным и специфичным (прогностическая ценность 74%) [14]. Другой цитокин IL-27 также является эффективным диагностическим маркером септического шока у пациентов младше 18 лет,

но не дает аналогичных результатов в исследованиях у взрослых [48]. M.F. Abasiyanik и соавт. заявляют, что оценка не абсолютного уровня провоспалительных цитокинов (IL-6, TNFα и др.), а их динамического изменения в крови играет важную роль в прогнозировании исходов у пациентов с септическим шоком [6].

Одним из перспективных биомаркеров септического шока является пентраксин-3 (Pentraxin 3, PTX3). PTX3 представляет собой белок острой фазы воспаления, участвующий в инфекционных процессах. Синтез PTX3 индуцируется цитокинами, такими как IL-1, TNFα, и агонистами TLR, но не IL-6 или интерфероном. PTX3 экспрессируется в различных клетках, таких как дендритные клетки, моноциты, эндотелиальные клетки или нейтрофилы во время воспалительных процессов. У здоровых людей уровни PTX3 в плазме крови практически не обнаруживаются (< 2 нг/мл) [69], но могут быстро повышаться при воспалительных и инфекционных состояниях. Уровни PTX3 повышены у тяжелобольных пациентов с сепсисом и/или септическим шоком. В систематическом обзоре и метаанализе PTX3 достоверно предсказал тяжесть заболевания и смертность при сепсисе (ОР = 1,91, 95% ДИ: 1,53–2,46, p < 0,0001) [39]. Несколько исследований обнаружили повышенную экспрессию PTX3 из-за действия различных инфекционных микроорганизмов, таких как *Aspergillus fumigatus, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, Neisseria meningitidis* и множественных вирусов. В исследовании S. Hamed и соавт. среди пациентов с септическим шоком в их первый день пребывания в ОРИТ дискриминационная возможность PTX3 составляла AUC = 0,81 (0,77–0,86), p = 0,0001, а на восьмой день — AUC = 0,79 (0,72–0,85), p = 0,0001 [30]. В исследовании J. Song и соавт. было показано, что применение комбинированного биомаркера IL-6+PTX3 повышает вероятность выделения септического шока среди других критических состояний (чувствительность — 82,7%, специфичность — 71,1%, AUC = 0,806) [60]. В другом исследовании было отмечено, что PTX3 является не только диагностическим, но и прогностическим биомаркером, коррелирующим с исходом у пациента. H. Jie и соавт. продемонстрировали, что уровень PTX3 был единственным независимым фактором риска 28-дневной смертности от септического шока при однофакторном и многофакторном анализе Кокса (ОР = 3,87; 95% ДИ: 1,66–8,81, p = 0,004). Среди умерших пациентов отмечались значительно более высокие уровни PTX3 (в 1 день, 2 день и 3 день), чем у выживших (p < 0,001). Результаты кривых Каплана–Мейера показали, что высокий уровень PTX3 (выше среднего значения) был статистически связан с более низкой 28-дневной выживаемостью (p = 0,014) [36].

Если говорить о других лабораторных методах диагностики, то перспективным направлением в молекулярной диагностике является липидомика, относящаяся к разделу метаболомики. Липидомика направлена на количественный анализ всего разнообразия липидов (липидома) в плазме крови. Существующая лабораторная диагностика, направленная на изучение липидного состава крови, не является специфичной, однако использование масс-спектрометрического анализа на уровне отдельных классов липидов повышает ее специфичность и прогностическую ценность в диагностике различных заболеваний. Многоцентровое исследование ALBIOS, целью которого было выявление связи между изменениями уровней метаболитов и развитием септического шока, показало, что у пациентов с летальным исходом из-за септического шока одним из предикторов смерти являлось снижение уровней фосфатидилхолина, содержащего длинноцепочечные полиненасыщенные жирные кислоты [15]. Другое исследование S. Tanaka и соавт., целью которого было выявление связи между уровнем липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) и развитием септического шока, показало, что у пациентов с септическим шоком концентрация ЛПВП, оцениваемая спустя 24 и 48 часов после поступления в ОРИТ, оказывалась ниже, чем у группы контроля. Авторы указывают, что ЛПВП, синтезируемые в ответ на грамотрицательные микроорганизмы, являются медиаторами острой фазы воспаления и способны выполнять защитную функцию по отношению к эндотелиальным клеткам. Результаты большинства предыдущих исследований, направленных на изучение улучшения исходов среди пациентов с септическим шоком путем ингибирования липополисахарида (ЛПС) и предотвращения связывания его с TLR4, регистрировали отсутствие улучшения выживания пациентов. S. Tanaka и соавт. демонстрируют, что ЛПВП в отличие от ингибиторов ЛПС способны изменять активность нейтрофилов и защищать эндотелиоциты от действия медиаторов воспаления. Были также выявлены ассоциации низкого уровня ЛПВП и смертельных исходов у пациентов с септическим шоком [61]. Исследование M. Trinder и соавт. продемонстрировало, что у людей с врожденными низкими концентрациями ЛПВП из-за генных мутаций риск смерти от сепсиса и септического шока более высок [62].

Как указывалось выше, важным звеном в развитии септического шока является тромбоцитопенический, и ДВС-синдром. D.R. Ko и соавт. пришли к выводу, что оценить тяжесть

септического шока, то есть оценить развивающуюся при нем тромботическую микроангиопатию (ТМА), можно количественно, определив уровень шистоцитов в плазме крови пациента [37]. ТМА характеризуется появлением в крови фрагментированных эритроцитов (шистоцитов), снижением числа тромбоцитов и увеличением уровни лактатдегидрогеназы (ЛДГ). При ДВС-синдроме активированный каскад коагуляции вызывает чрезмерное образование тромбов из-за избытка фибрина. Избыточное образование фибрина вызывает тромбоцитопению и снижение уровня факторов свертывания крови (коагулопатия потребления). Механическое повреждение эритроцитов избытком нитей фибрина в данном случае приводит к образованию шистоцитов. Снижение деформируемости эритроцитов развивается рано, в течение 24 часов после поступления в ОРИТ, и не восстанавливается у пациентов с септическим шоком. Эта деформируемость эритроцитов прогрессивно снижается в течение следующих 2–8 дней у пациентов и в значительной степени связана с формирующейся полиорганной недостаточностью [9]. Следовательно, повреждение эритроцитов при септическом шоке может привести к нарушению регуляции и механическим повреждениям микрососудистого русла, что играет важную роль в образовании шистоцитов. При диагностике ТМА важным критерием является наличие ≥ 1% шистоцитов в мазке периферической крови. Было доказано, что появление шистоцитов в крови является возможным предиктором развития полиорганной недостаточности, связанной с тромбоцитопенией. Более высокие показатели ТМА при поступлении и через 24 часа после госпитализации были тесно связаны с повышенным риском 30-дневной и 7-дневной смертности у пациентов с септическим шоком [9].

Другим перспективным методом оценки тяжести течения септического шока является определение уровня венозно-артериального CO_2 и артериально-венозного O_2. H. Zang и соавт. доказали, что соотношение уровня венозно-артериального CO_2 и артериально-венозного O_2 ($Cv\text{-}aCO_2/Da\text{-}vO_2$) является более чувствительным и специфичным предиктором гипоперфузии органов и тканей у пациентов с септическим шоком. Данное соотношение способно выявить пациентов с высоким риском неблагоприятных исходов [72]. G.A. Ospina-Tascón и соавт. в исследовании показали, что уровень смертности пациентов с септическим шоком на 7-й и 35-й день увеличился у тех, у кого соотношение уровня венозно-артериального CO_2 и артериально-венозного O_2 составляло больше 1 ($Cv\text{-}aCO_2/Da\text{-}vO_2 > 1$). Авторы указывают, что $Cv\text{-}aCO_2/Da\text{-}vO_2$ может использоваться для эффективной оценки успешности реанимационных мероприятий и выявления пациентов с высоким риском неблагоприятных исходов. Если соотношение $Cv\text{-}aCO_2/Da\text{-}vO_2 > 1$, только раннее вмешательство может улучшить прогноз таких пациентов [51].

Септический шок часто осложняется развитием ОПН. К факторам, которые повышают риск развития ОПН у пациентов с септическим шоком, относят позднее назначение антибактериальной терапии, переливание крови, применение ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента, высокие показатели скорости клубочковой фильтрации (СКФ) и наличие в анамнезе интраабдоминального сепсиса [52]. Существующие сегодня такие предикторы ОПН, как уровень креатинина в плазме крови и объем диуреза, не являются специфичными критериями. A. Hollinger и соавт. предлагают использовать чувствительный и специфичный маркер — проэнкефалин A119–159 (proenkephalin A119–159, penkid), который повышается в плазме крови после снижения почечной функции быстрее, чем креатинин. Увеличение концентрации проэнкефалина А высоко специфично для нарушения функции почек и не связано с другими внепочечными патологиями [31]. В недавних исследованиях было показано, что penkid является высокоспецифичным биомаркером ухудшения почечной функции и статистически достоверно связан с развитием ОПН через 48 часов у пациентов с септическим шоком и /или сепсисом (ОШ = 3,3; 95%ДИ 2,1–5,1; $p < 0.0001$) [13, 47]. Другим перспективным биомаркером развития ОПН при септическом шоке является гепарин-связывающий белок (Heparin-Binding Protein — HBP), также известный как азуроцидин или катионный антимикробный белок 37 kDa. Он является медиатором воспаления, который высвобождается из активированных нейтрофилов. Нейтрофилы, активированные бактериальным антигеном, высвобождают предварительно синтезированный HBP из секреторных пузырьков в периферические ткани и кровеносные сосуды. HBP фильтруется через клубочки, затем проникает в просвет канальцев. HBP вызывает воспаление в эпителиальных клетках канальцев, что подтверждается данными об увеличении продукции IL-6. Затем HBP воздействует на клетки перитубулярных сосудов, вызывая выход жидкости через ослабленные плотные соединения, что подтверждается данными об интерстициальном кровотечении и формировании белковых агрегатов во внеклеточном матриксе [64]. HBP недавно был предложен в качестве биомаркера для диагностики бактериального менингита и для раннего выявления в отделениях неотложной помощи пациентов

с риском развития сепсиса и/или септического шока [42]. Так, в исследовании A. Linder и соавт. было показано, что у пациентов с септическим шоком концентрация НВР превышала концентрацию НВР у пациентов группы контроля в 100 раз. В среднем концентрация НВР более 15 нг/мл, которая обнаруживается у 73,2% пациентов с сепсисом и/или септическим шоком, оценивается как диагностическая при данной патологии [41]. Y. Zhou и соавт. продемонстрировали, что при концентрации НВР у пациентов более 103,5 нг/мл чувствительность и специфичность данного биомаркера в качестве диагностики септического шока составляет 67,6 и 82,1% соответственно [74].

Оценить степень сердечной недостаточности у пациентов с септическим шоком можно по результатам эхокардиографии, концентрациям тропонинов I и натрийуретических пептидов N-концевого pro-b-типа (NTproBNP). В исследовании P. Rahasto и соавт. было показано, что среди пациентов с септическим шоком, у которых наблюдался высокий уровень тропонина I, риск смерти был в 1,6 раза выше, чем у других пациентов (ОР = 1,6; p = 0,004) [54]. Уровни NT-proBNP в плазме крови демонстрируют значимость для оценки прогноза пациентов с дисфункцией миокарда, вызванной септическим шоком. Уровень NT-proBNP в плазме крови является независимым прогностическим маркером смертности и снижения функции миокарда. В исследовании W. Chen и соавт. в группе пациентов с сердечной дисфункцией (n = 47) уровни NT-proBNP были выше, чем в группе пациентов с другой дисфункцией (n = 55), и значимо выше в группе невыживших. В многомерном логистическом регрессионном анализе уровень NT-proBNP был независимым предиктором 28-дневной смертности ($p < 0,05$) [19]. Одним из эффективных методов мониторинга сердечно-сосудистой деятельности является использование технологии PiCCO (Pulse-Indicated Continuous Cardiac Output) — непрерывное измерение сердечного выброса. Результаты исследования N. Lu и соавт. показали, что лечение в соответствии с показателями PiCCO может снизить тяжесть течения септического шока, что сократит длительность пребывания пациентов в отделении интенсивной терапии [44]. Если говорить о других перспективных методах прогноза жизни пациентов с септическим шоком, то X.T. Wang и соавт. продемонстрировали, что величина центрального венозного давления (ЦВД) может являться диагностическим критерием тяжести септического шока. Раннее снижение ЦВД ассоциировано с синдромом полиорганной недостаточности, который в большинстве случаев осложняет течение септического шока. Было показано, что снижение ЦВД менее чем на 8 мм рт.ст. в группе пациентов с септическим шоком связано с лучшей выживаемостью [66].

Печеночная недостаточность, осложняющая септический шок, оказывает значительное влияние на смертность. Патофизиология дисфункции печени, связанной с септическим шоком и/или сепсисом, очень сложна и еще недостаточно изучена. Согласно критериям Surviving Sepsis Campaign (SSC) диагноз печеночной недостаточности в данном случае должен быть основан на повышении концентрации билирубина > 2 мг/дл и нарушениях свертывания крови с МНО > 1,5. Отсутствие высокой специфичности и способности отличить острую печеночную недостаточность от предшествующей септическому шоку патологии печени делает билирубин неэффективным биомаркером для использования в качестве только единственного параметра, отражающего функцию печени. В данном случае необходимо проводить расширенное исследование функции печени. Клинические проявления патологии печени, связанной с септическим шоком, включают в себя гипоксический гепатит (ишемический гепатит, «шоковая» печень), холестаз и дисфункцию синтеза белка, проявляющуюся коагулопатией. Нарушение детоксикационной функции печени, проявляющееся спутанностью сознания, потерей сознания и печеночной энцефалопатией, может быть замаскировано аналгоседацией, применяемой в отделении интенсивной терапии. В клинической практике не существует стандартизированной диагностической панели, которая позволила бы поставить точный диагноз на ранней стадии острой печеночной недостаточности, а также терапевтической панели, позволяющей полностью восстановить функции печени [67]. В исследовании было показано, что у пациентов с острой печеночной недостаточностью септический шок характеризуется выраженной гиперлактатемией и повышенной активностью ренин-ангиотензин-альдостероновой системы [63].

Заключение

По данным ВОЗ в мире ежегодное число случаев септического шока составляет 24 млн. К факторам риска развития септического шока относятся возраст старше 65 лет, мужской пол, наличие хронических заболеваний, иммуносупрессия и травмы. Отдельной проблемой на сегодняшний день является септический шок фунгальной этиологии. Многочисленные исследования показывают, что генерализованная форма кандидозной инфекции в 40% случаев осложняется развитием септического шока. Основными патогенетическими звеньями септического шока являются иммуновоспа-

лительные реакции, которые приводят к повреждению эндотелия, и реакции, происходящие на уровне микроциркуляторного русла, которые приводят к ишемическим расстройствам тканей и органов. Доказано, что в основе развития таких осложнений септического шока, как сердечная, печеночная и почечная недостаточность, а также повреждения головного мозга, лежат ишемические расстройства, эндотелиальная дисфункция и микротромбоз. Однако исследователи предполагают, что ряд микроорганизмов, вызывающих септический шок (например, *Neisseria meningitidis* и др.), обладают тропизмом к надпочечникам, что обуславливает воспаление в паренхиме органов и развитие такой патологии, как острая надпочечниковая недостаточность. Среди перспективных лабораторных методов диагностики септического шока можно выделить оценку уровня пентраксина-3, являющегося белком острой фазы воспаления. Другим важным аспектом в лабораторной диагностике является липидомика. Липидомика, относящаяся к омиксным технологиям, представляет собой современное направление диагностики многих заболеваний, в том числе, и септического шока. Доказано, что снижение уровня фосфатидилхолина и ЛПВП является независимым прогностическим фактором развития септического шока. Оценить тяжесть течения септического шока позволяет определение количества шистоцитов в крови, величина ЦВД и соотношение уровня венозно-артериального CO_2 и артериально-венозного O_2. Определить ухудшение состояния пациента и начало формирования полиорганной недостаточности можно благодаря разным методам. Оценка уровня проэнкефалина A119–159 и гепаринсвязывающего белка отражает развитие острой почечной недостаточности; эхокардиография, оценка концентраций тропонинов I и натрийуретических пептидов N-концевого pro-b-типа позволяют изучить риск наступления сердечной недостаточности, а выраженная гиперлактатемия в совокупности с повышением концентрации билирубина > 2 мг/дл и МНО > 1,5 позволяет судить о наступлении острой печеночной недостаточности. Дальнейшие исследования, направленные на изучение и разработку новых перспективных методов диагностики септического шока, позволят снизить риск развития полиорганной недостаточности.

Список литературы/References

1. Курмышкина О.В., Богданова А.А., Волкова Т.О., Полторак А.Н. Септический шок: врожденные молекулярно-генетические механизмы развития генерализованного воспалительного процесса // Онтогенез. 2015. Т. 46, № 4. С. 225–239. [Kurmyshkina O.V., Bogdanova A.A., Volkova T.O., Poltorak A.N. Septic shock: innate molecular genetic mechanisms of the development of generalized inflammation. *Ontogenez = Ontogenesis, 2015, vol. 46, no. 4, pp. 225–239. (In Russ.)*] *doi: 10.7868/S0475145015040060*
2. Макацария А.Д., Акиньшина С.В., Бицадзе В.О., Хизроева Д.Х., Казакова Л.А., Гадаева З.К. Септический шок в акушерстве: новый взгляд на патогенез // Практическая медицина. 2012. Т. 65, № 9. С. 11–23. [Makatsariya A.D., Akinshina S.V., Bitsadze V.O., Hizroeva D.H., Kazakova L.A., Gadaeva Z.K. Septic shock in obstetrics: a new look at the pathogenesis. *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine, 2012, vol. 65, no. 9, pp. 11–23. (In Russ.)*]
3. Макацария А.Д., Серов В.Н., Суконцева Т.А., Бицадзе В.О., Шкода А.С., Хизроева Д.Х., Воробьев А.В. Вопросы патогенеза коагулопатии при септическом шоке // Акушерство и гинекология. 2019. № 10. С. 13–21. [Makatsariya A.D., Serov V.N., Sukontseva T.A., Bitsadze V.O., Shkoda A.S., Khizroeva D.Kh., Vorobyev A.V. The issues of the pathogenesis of coagulopathy in septic shock. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynegology, 2019, no. 10, pp. 13–21. (In Russ.)*] *doi: 10.18565/aig.2019.10.13-21*
4. Никитин Е.А., Клейменов К.В., Батиенко Д.Д., Акуленко Д.А., Селиверстов П.В., Добрица В.П., Радченко В.Г. Новые подходы к воздействию на патогенетические звенья сепсиса // Медицинский совет. 2019. Т. 21. С. 240–246. [Nikitin E.A., Kleymenov K.V., Batienco D.D., Akulenko D.A., Seliverstov P.V., Dobritsa V.P., Radchenko V.G. New approaches to the impact on the pathogenetic links of sepsis. *Meditsinskiy sovet = Medical Council, 2019, vol. 21, pp. 240–246. (In Russ.)*] *doi: 10.21518/2079-701X-2019-21-240-246*
5. Чирский В.С., Андреева Е.А., Юзвинкевич А.К., Гайворонский И.В. Патологоанатомическая характеристика септического шока в условиях современной терапии // Журнал анатомии и гистопатологии. 2020. Т. 9, № 1. С. 69–76. [Chirskii V.S., Andreeva E.A., Yuzvinkevich A.K., Gaivoronskii I.V. Pathomorphological characteristics of septic shock in modern therapy. *Zhurnal anatomii i gistopatologii = Journal of Anatomy and Histopathology, 2020, vol. 9, no. 1, pp. 69–76. (In Russ.)*] *doi: 10.18499/2225-7357-2020-9-1-69-76*
6. Abasiyanik M.F., Wolfe K., Van Phan H., Lin J., Laxman B., White S.R., Verhoef P.A., Mutlu G.M., Patel B., Tay S. Ultrasensitive digital quantification of cytokines and bacteria predicts septic shock outcomes. *Nat. Commun., 2020, vol. 11, no. 1: 2607. doi: 10.1038/s41467-020-16124-9*
7. Annane D. Adrenal insufficiency in sepsis. *Curr. Pharm. Des., 2008, vol. 14, no. 19, pp. 1882–1886. doi: 10.2174/138161208784980626*
8. Bassetti M., Vena A., Meroi M., Cardozo C., Cuervo G., Giacobbe D.R., Salavert M., Merino P., Gioia F., Fernández-Ruiz M., López-Cortés L.E., Almirante B., Escolà-Vergé L., Montejo M., Aguilar-Guisado M., Puerta-Alcalde P., Tasias M., Ruiz-Gaitán A., González F., Puig-Asensio M., Marco F., Pemán J., Fortún J., Aguado J.M., Soriano A., Carratalá J., Garcia-Vidal C., Valerio M., Sartor A., Bouza E., Muñoz P. Factors associated with the development of septic shock in patients with candidemia: a post hoc analysis from two prospective cohorts. *Crit. Care, 2020, vol. 24, no. 1: 117. doi: 10.1186/s13054-020-2793-y*

9. Bateman R.M., Sharpe M.D., Singer M., Ellis C.G. The effect of sepsis on the erythrocyte. *Int. J. Mol. Sci., 2017, vol. 18, no. 9: 1932. doi: 10.3390/ijms18091932*
10. Beck V., Chateau D., Bryson G.L., Pisipati A., Zanotti S., Parrillo J.E., Kumar A.; Cooperative Antimicrobial Therapy of Septic Shock (CATSS) Database Research Group. Timing of vasopressor initiation and mortality in septic shock: a cohort study. *Crit. Care, 2014, vol. 18, no. 3: R97. doi: 10.1186/cc13868*
11. Bedet A., Razazi K., Boissier F., Surenaud M., Hue S., Giraudier S., Brun-Buisson C., Mekontso Dessap A. Mechanisms of thrombocytopenia during septic shock: a multiplex cluster analysis of endogenous sepsis mediators. *Shock, 2018, vol. 49, no. 6, pp. 641–648. doi: 10.1097/SHK.0000000000001015*
12. Brusletto B.S., Løberg E.M., Hellerud B.C., Goverud I.L., Berg J.P., Olstad O.K., Gopinathan U., Brandtzaeg P., Øvstebø R. Extensive changes in transcriptomic "fingerprints" and immunological cells in the large organs of patients dying of acute septic shock and multiple organ failure caused by Neisseria meningitidis. *Front. Cell Infect. Microbiol., 2020, no. 10: 42. doi: 10.3389/fcimb.2020.00042*
13. Caironi P., Latini R., Struck J., Hartmann O., Bergmann A., Bellato V., Ferraris S., Tognoni G., Pesenti A., Gattinoni L., Masson S.; ALBIOS Study Investigators. Circulating proenkephalin, acute kidney injury, and its improvement in patients with severe sepsis or shock. *Clin. Chem., 2018, vol. 64, no. 9, pp. 1361–1369. doi: 10.1373/clinchem.2018.288068*
14. Calfee C.S., Thompson B.T., Parsons P.E., Ware L.B., Matthay M.A., Wong H.R. Plasma interleukin-8 is not an effective risk stratification tool for adults with vasopressor-dependent septic shock. *Crit. Care Med., 2010, vol. 38, no. 6, pp. 1436–1441. doi: 10.1097/CCM.0b013e3181de42ad*
15. Cambiaghi A., Díaz R., Martinez J.B., Odena A., Brunelli L., Caironi P., Masson S., Baselli G., Ristagno G., Gattinoni L., Oliveira E., Pastorelli R., Ferrario M. An innovative approach for the integration of proteomics and metabolomics data in severe septic shock patients stratified for mortality. *Sci. Rep., 2018, no. 8: 6681. doi: 10.1038/s41598-018-25035-1*
16. Chang J.C. Hemostasis based on a novel 'two-path unifying theory' and classification of hemostatic disorders. *Blood Coagul. Fibrinolysis, 2018, vol. 29, no. 7, pp. 573–584. doi: 10.1097/MBC.0000000000000765*
17. Chang J.C. Sepsis and septic shock: endothelial molecular pathogenesis associated with vascular microthrombotic disease. *Thromb. J., 2019, no. 7: 10. doi: 10.1186/s12959-019-0198-4*
18. Chang J.C. Thrombocytopenia in critically ill patients due to vascular microthrombotic disease: pathogenesis based on "two activation theory of the endothelium". *Vascul. Dis. Ther., 2017, no. 2, pp. 1–7. doi: 10.15761/VDT.1000132*
19. Chen W., Zhao L., Liu P., Sheng B., Zhen J. The predictive value of plasma N-terminal pro-B-type natriuretic peptide levels in the evaluation of prognosis and the severity of patients with septic shock induced myocardial suppression. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue, 2013, vol. 25, no. 1, pp. 40–44. doi: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2013.01.011*
20. Dienstmann G., Avi K.T., Leite L.A.C., Alano J.S., Souza M.L.R., Mulazani M.D.S., Mendivil P.C.G. First case report of fulminant septic shock from meningococcemia associated with Cryptococcus neoformans coinfection in an immunocompetent patient. *Med. Mycol. Case Rep., 2019, no. 26, pp. 44–46. doi: 10.1016/j.mmcr.2019.10.003*
21. Dugas A.F., Mackenhauer J., Salciccioli J.D., Cocchi M.N., Gautam S., Donnino M.W. Prevalence and characteristics of nonlactate and lactate expressors in septic shock. *J. Crit. Care., 2012, vol. 27, no. 4, pp. 344–350. doi: 10.1016/j.jcrc.2012.01.005*
22. Falcone M., Tiseo G., Gutiérrez-Gutiérrez B., Raponi G., Carfagna P., Rosin C., Luzzati R., Delle Rose D., Andreoni M., Farcomeni A., Venditti M., Rodríguez-Baño J., Menichetti F.; GISA (Italian Group for Antimicrobial Stewardship). Impact of initial antifungal therapy on the outcome of patients with candidemia and septic shock admitted to medical wards: a propensity score-adjusted analysis. *Open Forum Infect. Dis., 2019, vol. 6, no. 7: ofz251. doi: 10.1093/ofid/ofz251*
23. Fan S.L., Miller N.S., Lee J., Remick D.G. Diagnosing sepsis — the role of laboratory medicine. *Clin. Chim. Acta., 2016, no. 460, pp. 203–210. doi: 10.1016/j.cca.2016.07.002*
24. Filbin M.R., Lynch J., Gillingham T.D., Thorsen J.E., Pasakarnis C.L., Nepal S., Matsushima M., Rhee C., Heldt T., Reisner A.T. Presenting symptoms independently predict mortality in septic shock: importance of a previously unmeasured confounder. *Crit. Care Med., 2018, vol. 46, no. 10, pp. 1592–1599. doi: 10.1097/CCM.0000000000003260*
25. Ganjoo S., Ahmad K., Qureshi U.A., Mir Z.H. Clinical epidemiology of SIRS and sepsis in newly admitted children. *Indian J. Pediatr., 2015, vol. 82, no. 8, pp. 698–702. doi: 10.1007/s12098-014-1618-x*
26. Gårdlund B., Dmitrieva N.O., Pieper C.F., Finfer S., Marshall J.C., Taylor Thompson B. Six subphenotypes in septic shock: latent class analysis of the PROWESS shock study. *J. Crit. Care, 2018, no. 47, pp. 70–79. doi: 10.1016/j.jcrc.2018.06.012*
27. Garofalo A.M., Lorente-Ros M., Goncalvez G., Carriedo D., Ballén-Barragán A., Villar-Fernández A., Peñuelas Ó., Herrero R., Granados-Carreño R., Lorente J.A. Histopathological changes of organ dysfunction in sepsis. *Intensive Care Med. Exp., 2019, no. 7 (1): doi: 10.1186/s40635-019-0236-3*
28. Guillamet C.V., Vazquez R., Micek S.T., Ursu O., Kollef M. Development and validation of a clinical prediction rule for candidemia in hospitalized patients with severe sepsis and septic shock. *J. Crit. Care, 2015, vol. 30, no. 4, pp. 715–720. doi: 10.1016/j.jcrc.2015.03.010*
29. Guzman J.A., Tchokonte R., Sobel J.D. Septic shock due to candidemia: outcomes and predictors of shock development. *J. Clin. Med. Res., 2011, vol. 3, no. 2, pp. 65–71. doi: 10.4021/jocmr536w*
30. Hamed S., Behnes M., Pauly D., Lepiorz D., Barre M., Becher T. Diagnostic value of pentraxin-3 in patients with sepsis and septic shock in accordance with latest sepsis-3 definitions. *BMC Infect. Dis., 2017, vol. 17, no. 1: 554. doi: 10.1186/s12879-017-2606-3*
31. Hollinger A., Wittebole X., François B., Pickkers P., Antonelli M., Gayat E., Chousterman B.G., Lascarrou J.B., Dugernier T., Di Somma S., Struck J., Bergmann A, Beishuizen A., Constantin J.M., Damoisel C., Deye N., Gaudry S., Huberlant V., Marx G., Mercier E., Oueslati H., Hartmann O., Sonneville R., Laterre P.F., Mebazaa A., Legrand M. Proenkephalin A 119-159 (Penkid) is an early biomarker of septic acute kidney injury: the kidney in sepsis and septic shock (Kid-SSS) study. *Kidney Int. Rep., 2018, vol. 3, no. 6, pp. 1424–1433. doi: 10.1016/j.ekir.2018.08.006*
32. Hotchkiss R.S., Moldawer L.L., Opal S.M., Reinhart K., Turnbull I.R., Vincent J.L. Sepsis and septic shock. *Nat. Rev. Dis. Primers, 2016, no. 2: 16045. doi: 10.1038/nrdp.2016.45*

33. Hu Q., Hao C., Tang S. From sepsis to acute respiratory distress syndrome (ARDS): emerging preventive strategies based on molecular and genetic researches. *BioSci. Rep., 2020, vol. 40, no. 5: BSR20200830. doi: 10.1042/BSR20200830*
34. Inthasot V., Goushchi A., Lazzaroni S., Papaleo A., Galdon M.G., Chochrad D. Fatal septic shock associated with herpes simplex virus hepatitis: a case report. *Eur. J. Case Rep. Intern. Med., 2018, vol. 5, no. 12: 000982. doi: 10.12890/2018_000982*
35. Jamme M., Daviaud F., Charpentier J., Marin N., Thy M., Hourmant Y., Mira J.P., Pène F. Time course of septic shock in immunocompromised and nonimmunocompromised patients. *Crit. Care Med., 2017, vol. 45, no. 12, pp. 2031–2039. doi: 10.1097/CCM.0000000000002722*
36. Jie H., Li Y., Pu X., Ye J. Pentraxin 3, a predicator for 28-day mortality in patients with septic shock. *Am. J. Med. Sci., 2017, vol. 353, no. 3, pp. 242–246. doi: 10.1016/j.amjms.2017.01.003*
37. Ko D.R., Kong T., Lee H.S., Kim S., Lee J.W., Chung H.S., Chung S.P., You J.S., Park J.W. Usefulness of the thrombotic microangiopathy score as a promising prognostic marker of septic shock for patients in the emergency department. *J. Clin. Med., 2019, vol. 8, no. 6: 808. doi: 10.3390/jcm8060808*
38. Lee S.G., Song J., Park D.W., Moon S., Cho H.J., Kim J.Y., Park J., Cha J.H. Prognostic value of lactate levels and lactate clearance in sepsis and septic shock with initial hyperlactatemia: a retrospective cohort study according to the Sepsis-3 definitions. *Medicine (Baltimore), 2021, vol. 100, no. 7: e24835. doi: 10.1097/MD.0000000000024835*
39. Lee Y.T., Gong M., Chau A., Wong W.T., Bazoukis G., Wong S.H., Lampropoulos K., Xia Y., Li G., Wong M.C.S., Liu T., Wu W.K.K., Tse G.; International Heath Informatics Study (IHIS) Network. Pentraxin-3 as a marker of sepsis severity and predictor of mortality outcomes: a systematic review and meta-analysis. *J. Infect., 2018, vol. 76, no. 1, pp. 1–10. doi: 10.1016/j.jinf.2017.10.016*
40. Lerolle N., Nochy D., Guérot E., Bruneval P., Fagon J.Y., Diehl J.L., Hill G. Histopathology of septic shock induced acute kidney injury: apoptosis and leukocytic infiltration. *Intensive Care Med., 2010, vol. 36, no. 3, pp. 471–478. doi: 10.1007/s00134-009-1723-x*
41. Linder A., Åkesson P., Inghammar M., Treutiger C.J., Linnér A., Sundén-Cullberg J. Elevated plasma levels of heparin-binding protein in intensive care unit patients with severe sepsis and septic shock. *Crit. Care, 2012, vol. 16, no. 3: R90. doi: 10.1186/cc11353*
42. Linder A., Christensson B., Herwald H., Björck L., Akesson P. Heparin-binding protein: an early marker of circulatory failure in sepsis. *Clin. Infect. Dis., 2009, vol. 49, no. 7, pp. 1044–1050. doi: 10.1086/605563*
43. Lipinska-Gediga M. Sepsis and septic shock-is a microcirculation a main player? *Anaesthesiol. Intensive Ther., 2016, vol. 48, no. 4, pp. 261–265. doi: 10.5603/AIT.a2016.0037*
44. Lu N., Zheng R., Lin H., Shao J., Yu J. Clinical studies of surviving sepsis bundles according to PiCCO on septic shock patients. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue, 2014, vol. 26, no. 1, pp. 23–27. doi: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.01.005*
45. Maestraggi Q., Lebas B., Clere-Jehl R., Ludes P.O., Chamaraux-Tran T.N., Schneider F., Diemunsch P., Geny B., Pottecher J. Skeletal muscle and lymphocyte mitochondrial dysfunctions in septic shock trigger ICU-acquired weakness and sepsis-induced immunoparalysis. *BioMed. Res. Int., 2017, no. 2017: 897325. doi: 10.1155/2017/7897325*
46. Mahapatra S., Heffner A.C. Septic Shock. In: StatPearls. Treasure Island (FL). *StatPearls Publishing, 2020. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430939*
47. Marino R., Struck J., Hartmann O., Maisel A.S., Rehfeldt M., Magrini L., Melander O., Bergmann A., Di Somma S. Diagnostic and short-term prognostic utility of plasma pro-enkephalin (pro-ENK) for acute kidney injury in patients admitted with sepsis in the emergency department. *J. Nephrol., 2015, vol. 28, no. 6, pp. 717–724. doi: 10.1007/s40620-014-0163-z*
48. Monserrat J., de Pablo R., Diaz-Martín D., Rodríguez-Zapata M., de la Hera A., Prieto A., Alvarez-Mon M. Early alterations of B cells in patients with septic shock. *Crit. Care, 2013, vol. 17, no. 3: R105. doi: 10.1186/cc12750*
49. Mouncey P.R., Osborn T.M., Power G.S., Harrison D.A., Sadique M.Z., Grieve R.D., Jahan R., Harvey E.S., Bell D., Bion J.F., Coats T.J., Singer M., Duncan Young J., Rowan M.K. Trial of early, goal-directed resuscitation for septic shock. *N. Engl. J. Med., 2015, vol. 372, no. 14, pp. 1301–1311. doi: 10.1056/NEJMoa1500896*
50. Ng K., Schorr C., Reboli A.C., Zanotti S., Tsigrelis C. Incidence and mortality of sepsis, severe sepsis, and septic shock in intensive care unit patients with candidemia. *Infect. Dis (Lond)., 2015, vol. 47, no. 8, pp. 584–587. doi: 10.3109/23744235.2015.1028100*
51. Ospina-Tascón G.A., Umaña M., Bermúdez W., Bautista-Rincón D.F., Hernandez G., Bruhn A., Granados M., Salazar B., Arango-Dávila C., De Backer D. Combination of arterial lactate levels and venous-arterial CO2 to arterial-venous O2 content difference ratio as markers of resuscitation in patients with septic shock. *Intensive Care Med., 2015, no. 41, pp. 796–805. doi: 10.1007/s00134-015-3720-6*
52. Plataki M., Kashani K., Cabello-Garza J., Maldonado F., Kashyap R., Kor D.J., Gajic O., Cartin-Ceba R. Predictors of acute kidney injury in septic shock patients: an observational cohort study. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol., 2011, vol. 6, no. 7, pp. 1744–1751. doi: 10.2215/CJN.05480610*
53. Polat G., Ugan R.A., Cadirci E., Halici Z. Sepsis and septic shock: current treatment strategies and new approaches. *Eurasian J. Med., 2017, vol. 49, no. 1, pp. 53–58. doi: 10.5152/eurasianjmed.2017.17062*
54. Rahasto P., Setianto B., Timan I.S., Suhendro S., Sukrisman L., Sukamawan R., Sudaryo M.K., Kabo P. Cardiac performance by echocardiography, cardiovascular biomarker, kidney function, and venous oxygen saturation as mortality predictors of septic shock. *Acta Med. Indones., 2019, vol. 51, no. 1, pp. 47–53.*
55. Riviere P., Patin D., Delaporte E., Mahfoudi H., Lecailtel S., Poher F., Villette P., Duclaux J., Jouault P., Brunin G. Septic shock secondary to an acute necrotizing community-acquired pneumonia with bacteremia due to Pseudomonas aeruginosa. *IDCases, 2019, no. 17: e00563. doi: 10.1016/j.idcr.2019.e00563*
56. Russell J.A., Rush B., Boyd J. Pathophysiology of septic shock. *Crit. Care Clin., 2018, vol. 34, no. 1, pp. 43–61. doi: 10.1016/j.ccc.2017.08.005*
57. Samannodi M., Zhao A., Nemshah Y., Shiley K. Plesiomonas shigelloides septic shock leading to death of postsplenectomy patient with pyruvate kinase deficiency and hemochromatosis. *Case Rep. Infect. Dis., 2016, no. 2016: 1538501. doi: 10.1155/2016/1538501*
58. Sanz D., D'Arco F., Robles C.A., Brierley J. Incidence and pattern of brain lesions in paediatric septic shock patients. *Br. J. Radiol., 2018, vol. 91, no. 1084: 20170861. doi: 10.1259/bjr.20170861*

59. Singer M., Deutschman C.S., Seymour C.W., Shankar-Hari M., Annane D., Bauer M., Bellomo R., Bernard G.R., Chiche J.-D., Coopersmith C.M., Hotchkiss R.S., Levy M.M., Marshall J.C., Martin G.S., Opal S.M., Rubenfeld G.D., Poll T., Vincent J.-L., Angus D.C. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA, 2016, vol. 315, no. 8, pp. 801–810. doi: 10.1001/jama.2016.0287*
60. Song J., Park D.W., Moon S., Cho H.J., Park J.H., Seok H. Diagnostic and prognostic value of interleukin-6, pentraxin 3, and procalcitonin levels among sepsis and septic shock patients: a prospective controlled study according to the Sepsis-3 definitions. *BMC Infect. Dis., 2019, vol. 19, no. 1: 968. doi: 10.1186/s12879-019-4618-7*
61. Tanaka S., Diallo D., Delbosc S., Genève C., Zappella N., Yong-Sang J., Patche J., Harrois A., Hamada S., Denamur E., Montravers P., Duranteau J., Meilhac O. High-density lipoprotein (HDL) particle size and concentration changes in septic shock patients. *Ann. Intensive Care, 2019, vol. 9, no. 1: 68. doi: 10.1186/s13613-019-0541-8*
62. Trinder M., Genga K.R., Kong H.J., Blauw L.L., Lo C., Li X., Cirstea M., Wang Y., Rensen P.C.N., Russell J.A., Walley K.R., Boyd J.H., Brunham L.R. Cholesteryl ester transfer protein influences high-density lipoprotein levels and survival in sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2019, vol. 199, no. 7, pp. 854–862. doi: 10.1164/rccm.201806-1157OC*
63. Tsai M.H., Chen Y.C., Lien J.M., Tian Y.C., Peng Y.S., Fang J.T., Yang C., Tang J.H., Chu Y.Y., Chen P.C., Wu C.S. Hemodynamics and metabolic studies on septic shock in patients with acute liver failure. *J. Crit. Care, 2008, vol. 23, no. 4, pp. 468–472. doi: 10.1016/j.jcrc.2008.04.006*
64. Tverring J., Vaara S.T., Fisher J., Poukkanen M., Pettilä V., Linder A., FINNAKI Study Group. Heparin-binding protein (HBP) improves prediction of sepsis-related acute kidney injury. *Ann. Intensive Care, 2017, vol. 7, no. 1: 105. doi: 10.1186/s13613-017-0330-1*
65. Vekaria-Hirani V., Kumar R., Musoke R.N., Wafula E.M., Chipkophe I.N. Prevalence and management of septic shock among children admitted at the Kenyatta National Hospital, longitudinal survey. *Int. J. Pediatr., 2019, no. 2019: 1502963. doi: 10.1155/2019/1502963*
66. Wang X.T., Yao B., Liu D.W., Zhang H.M. Central venous pressure dropped early is associated with organ function and prognosis in septic shock patients: a retrospective observational study. *Shock, 2015, vol. 44, no. 5, pp. 426–430. doi: 10.1097/SHK.0000000000000445*
67. Woźnica E.A., Inglot M., Woźnica R.K., Łysenko L. Liver dysfunction in sepsis. *Adv. Clin. Exp. Med., 2018, vol. 27, no. 4, pp. 547–551. doi: 10.17219/acem/68363*
68. Yamaguchi H., Tanaka T., Maruyama A., Nagase H. Septic encephalopathy characterized by acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion and early nonconvulsive status epilepticus. *Case Rep. Neurol. Med., 2016, no. 2016: 7528238. doi: 10.1155/2016/7528238*
69. Yamasaki K., Kurimura M., Kasai T., Sagara M., Kodama T., Inoue K. Determination of physiological plasma pentraxin 3 (PTX3) levels in healthy populations. *Clin. Chem. Lab. Med., 2009, vol. 47, no. 4, pp. 471–477. doi: 10.1515/CCLM.2009.110*
70. Yang B., Wang J., Tao X., Wang D. Clinical investigation on the risk factors for prognosis in patients with septic shock. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue, 2019, vol. 31, no. 9, pp. 1078–1082. doi: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.09.004*
71. Yee C.R., Narain N.R., Akmaev V.R., Vemulapalli V. A data-driven approach to predicting septic shock in the intensive care unit. *BioMed Inform. Insights, 2019, no. 11: 1178222619885147. doi: 10.1177/1178222619885147*
72. Zang H., Shen X., Wang S., He Z., Cheng H. Evaluation and prognostic value of Cv-aCO_2/Da-vO_2 in patients with septic shock receiving fluid resuscitation Cv-aCO_2/Ca-vO_2. *Exp. Ther. Med., 2019, vol. 18, no. 5, pp. 3631–3635. doi: 10.3892/etm.2019.7956*
73. Zarbock A., Gomez H., Kellum J.A. Sepsis-induced acute kidney injury revisited: pathophysiology, prevention and future therapies. *Curr. Opin. Crit. Care, 2014, vol. 20, no. 6, pp. 588–595. doi: 10.1097/MCC.0000000000000153*
74. Zhou Y., Liu Z., Huang J., Li G., Li F., Cheng Y., Xie X., Zhang J. Usefulness of the heparin-binding protein level to diagnose sepsis and septic shock according to Sepsis-3 compared with procalcitonin and C reactive protein: a prospective cohort study in China. *BMJ Open, 2019, vol. 9, no. 4: e026527. doi: 10.1136/bmjopen-2018-026527*
75. Zuber B., Tran T.C., Aegerter P., Grimaldi D., Charpentier J., Guidet B., Mira J.P., Pène F.; CUB-Réa Network. Impact of case volume on survival of septic shock in patients with malignancies. *Crit. Care Med., 2012, vol. 40, no. 1, pp. 55–62. doi: 10.1097/CCM.0b013e31822d74ba*

Авторы:

Гоманова Л.И., студентка Института общественного здоровья им. Ф.Ф. Эрисмана ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

Фокина М.А., к.м.н., доцент кафедры патологии человека ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия.

Authors:

Gomanova L.I., Student of Erismann Institute of Public Health, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

Fokina M.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Human Pathology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 02.11.2021
Принята к печати 03.01.2022

Received 02.11.2021
Accepted 03.01.2022

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2022, vol. 12, no. 2, pp. 253–262

Инфекция и иммунитет
2022, Т. 12, № 2, с. 253–262

ВЫЯВЛЕНИЕ КОРРЕЛЯТОВ ПРОТЕКЦИИ ОТ *YERSINIA PESTIS* НА МЫШИНОЙ МОДЕЛИ И ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ИХ В КАЧЕСТВЕ МАРКЕРОВ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВАКЦИНАЦИИ У ЛЮДЕЙ

С.Н. Клюева, С.А. Бугоркова, Т.Н. Каштанова

ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», г. Саратов, Россия

Резюме. В условиях, когда оценка изменения уровня заболеваемости не может быть использована в качестве индикаторного показателя эффективности живой чумной вакцины, существует реальная необходимость поиска иных, в частности иммунологических, коррелятов защиты вакцинируемого. Цель работы — выявить иммунологические корреляты протекции от чумы у мышей, иммунизированных *Yersinia pestis* EV НИИЭГ, и оценить динамику отобранных маркеров у привитых против чумы людей. Мышей BALB/c иммунизировали *Y. pestis* EV в дозах 2×10^2, 1×10^3, 5×10^3, $2{,}5 \times 10^4$ КОЕ и на 21 сутки заражали *Y. pestis* 231 в дозе 400 LD_{50}. Иммуногенность рассчитывали по методу Кербера и определяли ImD_{50}. Добровольцы — 20 человек, впервые привитые вакциной чумной живой, и 20 человек, не прививавшиеся от чумы. Продукцию цитокинов определяли на анализаторе LAZURIT (Dynex Technologies, США) в крови у мышей перед заражением *Y. pestis* 231 на 14 и 21 сутки после вакцинации, у людей — до введения вакцины, через 1, 6 и 12 месяцев после вакцинации. У иммунизированных мышей отмечено достоверное повышение (в 2,2 раза) индуцированной продукции IFNγ и умеренное увеличение концентрации TNFα, IL-10 и IL-17A на 14 сутки иммуногенеза. Выявлена высокая корреляционная связь между показателем выживаемости животных и уровнем антиген-/митоген-индуцированной продукции IFNγ ($r = 0{,}94$, $p = 0{,}039$) как на 14, так и на 21 сутки, а также заметная связь с уровнем продукции IL-10 и IL-17A на 14 сутки иммуногенеза. У добровольцев через месяц после прививки отмечено значимое увеличение к 6 месяцу ($p < 0{,}05$) уровней IFNγ, TNFα, IL-10, IL-17A, хотя только для IFNγ и IL-17A отмечено сохранение индуцированной продукции на достаточно высоком уровне до года. Таким образом, возможными информативными коррелятами защиты мышей от *Y. pestis* на 14 и 21 сутки можно считать IFNγ и IL-17A, рассматривая повышение индуцированной продукции этих цитокинов в качестве адекватных маркеров протективной эффективности иммунизации, а оценка динамики этих показателей у добровольцев, привитых вакциной чумной живой, позволяет считать увеличение уровней IFNγ и IL-17A благоприятным прогностическим маркером иммунологической эффективности вакцины в период с 6 по 12 месяц наблюдения.

Ключевые слова: *Yersinia pestis, вакцина чумная живая, цитокины, протективность, иммуногенность, противочумный иммунитет.*

Адрес для переписки:
Клюева Светлана Николаевна
410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, 46,
ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб».
Тел.: 8 (452) 26-21-31 (раб.), 8 987 830-50-75 (моб.).
Факс: 8 (452) 51-52-12.
E-mail: klyueva.cvetlana@mail.ru

Contacts:
Svetlana N. Klyueva
410005, Russian Federation, Saratov, Universitetskaya str., 46,
Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe".
Phone: +7 (452) 26-21-31 (office), +7 987 830-50-75 (mobile).
Fax: +7 (452) 51-52-12.
E-mail: klyueva.cvetlana@mail.ru

Для цитирования:
Клюева С.Н., Бугоркова С.А., Каштанова Т.Н. Выявление коррелятов протекции от Yersinia pestis на мышиной модели и оценка возможности применения их в качестве маркеров эффективности вакцинации у людей // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 2. С. 253–262. doi: 10.15789/2220-7619-ICO-1734

Citation:
Klyueva S.N., Bugorkova S.A., Kashtanova T.N. Identifying correlates of protection from Yersinia pestis on a mouse model and assessing an opportunity for their use as markers of human vaccination efficiency // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 2, pp. 253–262. doi: 10.15789/2220-7619-ICO-1734

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-ICO-1734

IDENTIFYING CORRELATES OF PROTECTION FROM *YERSINIA PESTIS* ON A MOUSE MODEL AND ASSESSING AN OPPORTUNITY FOR THEIR USE AS MARKERS OF HUMAN VACCINATION EFFICIENCY

Klyueva S.N., Bugorkova S.A., Kashtanova T.N.

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Abstract. In case no assessment of changes in incidence rate can be used as an indicator for effectiveness of applied live plague vaccine, it is really necessary to search for other, particularly immunological correlates for vaccine-based protection. The aim of this study was to reveal immunological correlates for plague protection in mice immunized with *Yersinia pestis* EV NIIEG, and assess dynamics changes in select markers of plague vaccinated subjects. BALB/c mice were immunized with *Y. pestis* EV at dose of 2×10^2, 1×10^3, 5×10^3, 2.5×10^4 CFU, and on day 21 they were challenged with *Y. pestis* 231 at a dose of 400 LD_{50}. Immunogenicity was calculated by the Kerber method and ImD_{50} was determined. Volunteers — 20 subjects who were first vaccinated with live plague vaccine and 20 subjects who were not vaccinated against the plague. Blood cytokine production was measured on the LAZURIT analyzer (Dynex Technologies, USA) in mouse groups before *Y. pestis* 231 infection on day 14 as well as 21 days after vaccination, in humans — before vaccination, 1, 6 and 12 months after vaccination. The immunized mice showed a significant increase (by 2.2 times) in the induced production of IFNγ and a moderate increase in the concentration of TNFα, IL-10 and IL-17A on day 14 of disease. A high correlation was found between the survival rate of animals and the level of antigen-/mitogen-induced IFNγ production ($r = 0.94$, $p = 0.039$), both on day 14 and 21, as well as a noticeable relationship with the level of produced IL-10 and IL-17A on day 14. One month after vaccination volunteers had significantly increase by month 6 ($p < 0.05$) levels of IFNγ, TNFα, IL-10, IL-17A, although only for IFNγ and IL-17A, the persistence of induced production was noted at a fairly high level for up to a year. Thus, IFNγ and IL-17A can be considered as possible informative correlates of mouse protection against *Y. pestis* on days 14 and 21, considering the increase in the induced production of these cytokines as adequate markers of the protective efficacy of immunization, and assessing dynamics in these parameters of volunteers vaccinated with the plague live vaccine, the increase in the levels of IFNγ and IL-17A can be considered as a favorable prognostic marker of the immunological efficacy of the vaccine in the period from the month 6 to 12 of observation.

Key words: *Yersinia pestis, live plague vaccine, cytokines, protection, immunogenicity, anti-plague immunity.*

Введение

Существует ключевой критерий профилактической (эпидемиологической) эффективности вакцинации — это снижение уровня заболеваемости среди вакцинированного контингента. Однако для чумы такой критерий не применим, поскольку вспышки этой болезни в современных условиях носят спорадический характер [2]. Внесенная в национальный календарь прививок[1] по эпидемическим показаниям вакцина чумная живая (ВЧЖ), используемая для профилактики чумы согласно инструкции по применению, обеспечивает защиту в течение 6–12 месяцев. Но отсутствие четких данных относительно эффективности вакцины в период между 6-м и 12-м месяцем затрудняет принятие управленческих решений о применении ВЧЖ в очередном эпидемиологическом сезоне [7].

В настоящее время для целого ряда вакцин против инфекций, имеющих широкое распространение в популяции, установлены уровни специфических антител, обеспечивающие надежную защиту от патогенов [3]. В отношении ВЧЖ, несмотря на более чем полувековую историю ее применения, по сей день не существует критериев оценки вакцинации против чумы как профилактического мероприятия в связи с отсутствием случаев массового заболевания людей чумой. Попытки определения «защитного титра антител» для ВЧЖ в современных условиях позволили считать таковым титр антител к капсульному антигену F1 *Y. pestis* в диапазоне 1:160 и выше, причем было отмечено, что первичная вакцинация приводит к формированию и поддержанию такого уровня специфических антител лишь в период от 1-го до 4-х месяцев [20]. В то же время в экспериментальных исследованиях указывается на отсутствие связи между уровнем специфических антител к антигенам чумного микроба и антиинфекционной резистентностью биомоделей [14, 24, 25], не выявлено прямой корреляции между кратностью применения ВЧЖ и уровнем специфических антител к капсульному антигену (F1) чумного микроба [9]. Определение доступных иммунологических показателей у привитых, позволяющих корректно характеризовать не только иммунологическую эффективность ВЧЖ, но и быть сопоставимыми с эпидемиологической эффективностью мероприятия по специфической профилактике чумы, позволило бы обеспечить наиболее благоприятный режим применения препарата в условиях прогнозируе-

[1] Приказ Минздрава Российской Федерации от 21.03.2014 № 125н «О национальном календаре профилактических прививок и календаре профилактических прививок по эпидемическим показаниям».

мого на протяжении нескольких лет неблагополучия по чуме на территории природных очагов этой инфекции.

В формировании противочумного иммунитета ведущая роль принадлежит клеточным факторам защиты [4, 5, 10, 22], оцениваемым по изменению функционального состояния клеток иммунной системы и характеристике реакций, ассоциированных с Th1-, Th2-клеточным ответом цитокинов, поэтому адекватный подход к поиску биомаркеров (коррелятов защиты) поствакцинального иммунитета даст возможность определить среди комплекса оценочных критериев тот необходимый минимум, позволяющий наиболее достоверно судить об эпидемиологической эффективности вакцинации привитого контингента.

Цель работы — выявить иммунологические корреляты протекции от чумы у мышей, иммунизированных *Yersinia pestis* EV НИИЭГ, и оценить динамику отобранных маркеров иммунологической эффективности вакцинации у привитых против чумы людей.

Материалы и методы

Исследования проводили с вакцинным *Y. pestis* EV НИИЭГ и вирулентным *Y. pestis* 231 штаммами, полученными из «Государственной коллекции патогенных бактерий» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»). Культуру *Y. pestis* выращивали на агаре Хоттингера (pH 7,2) в течение 48 ч при 28°С. Из исходной взвеси (10^9 м.к.), приготовленной по стандарту мутности ОСО 42-28-59-85П готовили ряд десятикратных разведений для получения рабочих взвесей, которые содержали требуемое количество микробных клеток в 0,2 мл.

Мыши инбредной линии BALB/c (6–8 недель, масса 18–20 г), более чувствительной и восприимчивой к возбудителю чумы, были получены из отдела экспериментальных животных с виварием (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»). Все манипуляции с животными проводили в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 и национальным стандартом РФ ГОСТ Р53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Эксперименты и эвтаназию животных осуществляли в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». Программа экспериментальной работы с животными одобрена Комиссией по биоэтике при ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 7 от 29.10.2019).

В серии предварительных экспериментов для вирулентного штамма *Y. pestis* 231 была определена вызывающая гибель 50% биомоделей (LD_{50}) летальная доза, которая составила 3–9 КОЕ при подкожном введении бактерий. Мыши BALB/c (200 особей обоего пола) были разделены на четыре опытных и одну контрольную группу по 40 особей в каждой. I группу животных иммунизировали подкожно двухсуточной культурой *Y. pestis* EV НИИЭГ в концентрации 2×10^2 КОЕ, II группу — 1×10^3 КОЕ, III — 5×10^3 КОЕ, IV — $2{,}5 \times 10^4$ КОЕ. Контрольную группу (V) составили интактные мыши. На 14 и 21 сутки после иммунизации проводили заражение мышей подкожным введением вирулентного штамма *Y. pestis* 231 в дозе 400 LD_{50} (3600 КОЕ). Ежедневно в течение 20 дней после заражения в каждой группе регистрировали павших животных. Гибель от чумы подтверждали наличием чумного микроба в посевах крови на бульон Хоттингера pH 7,2 и органов на агар Хоттингера pH 7,2 с гемолизированной кровью и генцианвиолетом, а также соответствующей патологоанатомической картиной. Посевы инкубировали в течение 5 суток при температуре 28°С с ежедневным просмотром. Всех выживших животных по окончании наблюдения (21 сутки) выводили из эксперимента с помощью паров хлороформа. Иммуногенность определяли по показателю ImD_{50} (средняя иммунизирующая доза), который рассчитывали по методу Кербера по формуле: $\lg ImD_{50} = \lg Dn - \Delta(\Sigma Li - 0{,}5)$, где Dn — максимальная величина дозы; n — общее число испытанных доз; lgDn — логарифм максимальной иммунизирующей (фактической) дозы; Li — отношение числа животных, выживших при иммунизации данной дозой, к общему числу живоотных, которым эта доза была введена; i — соответствует номеру дозы, если считать наименьшую из испытанных доз первой; ΣLi — сумма значений, найденных для всех испытанных доз; Δ — логарифм кратности разведений [1].

Продукцию цитокинов в клеточных культурах крови мышей определяли перед заражением на 14 и 21 сутки. Для этого гепаринизированную кровь разводили в соотношении 1:4 средой RPMI 1640 (ПанЭко, Россия), содержащей 100 мкг/мл гентамицина (ОАО «Мосхимфармпрепараты» им. Н.А. Семашко). В качестве индукторов продукции цитокинов использовали обеззараженную нагреванием при 60°С в течение 1 ч 20 мин взвесь двухсуточной культуры *Y. pestis* EV НИИЭГ, приготовленную по стандартному образцу мутности ОСО 42-28-59-85П в 0,9% растворе натрия хлорида pH 7,2 в концентрации 10^9 м.к./мл [6], и стандартный Т-клеточный митоген конканавалин А (ПанЭко, Россия) в концентрации 15 мкг/мл. Опытные и контрольные образцы инкубировали в течение

24 часов при температуре 37°С. Клеточные суспензии осаждали центрифугированием при 300g в течение 15 мин, отбирали супернатанты. Индуцированную продукцию цитокинов определяли методом иммуноферментного анализа с помощью коммерческих наборов для определения IFNγ, TNFα, IL-4, IL-17 (Abcam, Англия), IL-10 (eBioscience, Австрия). Исследования выполняли на автоматическом иммуноферментном анализаторе LAZURIT (Dynex Technologies, США) при длине волны 450 нм.

Параллельно проводилась оценка иммунологической эффективности ВЧЖ на добровольцах. В исследовании приняли участие 20 добровольцев, впервые вакцинированных по эпидемическим показаниям ВЧЖ, в группу сравнения (20 человек) вошли лица, не прививавшиеся от чумы. От каждого добровольца было получено информированное согласие. Работа одобрена этическим комитетом при ФГБУ ВО Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского (протокол № 5 от 02.02.2016). Вакцинация проводилась ВЧЖ (производитель — ФКУЗ Ставропольский НИПЧИ, серия № 1-15) накожным способом в дозе 3×10^9 микробных клеток в 0,15 мл в соответствии с инструкцией по применению препарата. Кровь забирали из локтевой вены до вакцинации, а также через 1, 6 и 12 месяцев после ее проведения. Для определения продукции цитокинов венозную кровь с гепарином разводили в соотношении 1:4 средой RPMI 1640 (ПанЭко, Россия), содержащей 100 мкг/мл гентамицина (ОАО «Мосхимфармпрепараты» им. Н.А. Семашко). В качестве индуктора продукции цитокинов использовали стандартный Т-клеточный митоген конканавалин А (ПанЭко, Россия) в концентрации 15 мкг/мл. Продукцию цитокинов определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью коммерческих наборов для определения IFNγ, TNFα, IL-4, IL-10 (ЗАО «Вектор-Бест», Россия), IL-17A (eBioscience, Австрия) на автоматическом иммуноферментном анализаторе LAZURIT (Dynex Technologies, США).

Антитела к F1 *Yersinia pestis* определяли в сыворотках крови людей с помощью иммуноферментной тест-системы «ИФА-АТ-Ф1 YERSINIA PESTIS» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Россия) в соответствии с инструкцией по применению.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием стандартного пакета программ Microsoft Office Excel 2016, Statistica 10.0 (StatSoft Inc., 2010). Взаимосвязь между переменными определяли с помощью корреляционно-регрессионного анализа (коэффициент корреляции Пирсона). Достоверность различий сравниваемых величин оценивали с помощью парного t-критерия Стьюдента и W-критерия Уилкоксона.

Результаты

Проанализировав у экспериментальных животных на 14 и 21 сутки после иммунизации *Y. pestis* EV НИИЭГ реакцию ряда цитокинов, мы выявили среди них те, которые претерпевали наибольшие изменения как при антигенной (убитые клетки *Y. pestis* EV), так и митогенной (коммерческий препарат конканавалин А — стандартный Т-клеточный митоген) стимуляции клеток крови (табл. 1). Оценка антиген-/митоген-индуцированной продукции цитокинов отражает реактивность клеток иммунной системы и их готовность к реагированию на патоген.

По данным иммуноферментного анализа установлено существенное увеличение IFNγ в крови иммунизированных мышей как на 14, так и 21 сутки иммуногенеза по сравнению с показателями в группе контроля ($p < 0,05$).

С увеличением иммунизирующей дозы отмечено достоверное повышение антиген-/митоген-индуцированной продукции TNFα, IL-10 и IL-17A на 14 сутки иммуногенеза по сравнению с показателями в группе контроля ($p < 0,05$) и, напротив, на 21 сутки иммуногенеза повышение антиген-/митоген-индуцированной продукции IL-17A при иммунизации низкими дозами 2×10^2 и 1×10^3 КОЕ ($p < 0,05$) *Y. pestis* EV НИИЭГ.

Заражение иммунизированных биомоделей проводили в период становления иммунологической перестройки (14 сутки иммуногенеза) и по окончании формирования специфической защиты на 21 сутки [8]. Оценку иммуногенной (протективной) активности вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ при подкожной иммунизации мышей проводили по изменению показателя ImD_{50}.

Установлено, что показатели ImD_{50}, полученные при заражении лабораторных животных на 14 и 21 сутки, соответствуют требованиям фармакопейной статьи «Вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций» и не превышают 4×10^4 КОЕ для белых мышей. Иммуногенность вакцинного штамма *Y. pestis* EV была выше при заражении биопробных животных на 21 сутки. В этом случае показатель ImD_{50} был в 2,3 раза ниже, чем при заражении мышей на 14 сутки ($2,1 \times 10^3$ КОЕ и $4,9 \times 10^3$ КОЕ соответственно, $p < 0,05$). Установлено, что продолжительность жизни животных в IV группе ($2,5 \times 10^4$ КОЕ) при заражении как на 14, так и на 21 сутки была соответственно в 1,7 и 2,1 раза выше аналогичного показателя в контроле ($p < 0,05$) (рис.).

Полученные данные были проанализированы с помощью корреляционно-регрессионного анализа Пирсона. Выявлена сильная прямая

корреляционная связь показателя выживаемости животных в группах с уровнем антиген-индуцированной продукции IFNγ (r = 0,94, p = 0,039) при заражении мышей на 14 сутки после иммунизации, а также с уровнем митоген-индуцированной продукции (r = 0,90, p = 0,045) при заражении на 21 сутки.

Заметная корреляционная связь установлена на 14 сутки иммуногенеза между показателями выживаемости животных и уровнем антиген-индуцированной продукции TNFα (r = 0,88, p = 0,08), однако связь эта не являлась достоверной. Выявлена высокая корреляционная зависимость между показателем выживаемости животных и уровнем митоген-индуцированной продукции IL-10 и IL-17A на 14 сутки иммуногенеза (r = 0,94, p = 0,04).

У добровольцев через месяц после прививки повышались показатели митоген-индуцированной продукции всех определяемых цитокинов, но значимо увеличивались к 6 месяцу наблюдения (p < 0,05) уровни IFNγ, TNFα, IL-10, IL-17A, хотя лишь для IFNγ и IL-17A отмечено сохранение индуцированной продукции этих цитокинов на достаточно высоком уровне до года после прививки (табл. 2).

При оценке динамики титров специфических антител к капсульному антигену (F1) *Y. pestis* только у 30% привитых через месяц после вакцинации специфические антитела регистрировали на уровне 1:80–1:160 (табл. 2). К 12 месяцу после прививки доля лиц с титром специфических антител на уровне 1:80–1:320 не превышала 53%. Однако медианные зна-

Таблица 1. Индуцированная продукция цитокинов в супернатантах крови мышей линии BALB/c в динамике противочумного ответа *in vitro*, M±m

Table 1. Induced production of cytokines in blood supernatants of BALB/c mice in the dynamics of the anti-plague response *in vitro*, M±m

Цитокин Cytokine	**Доза, КОЕ** Dose, CFU	**14 сутки** 14 days		**21 сутки** 21 days	
		***Y. pestis* EV**	**Concanavalin A**	***Y. pestis* EV**	**Concanavalin A**
IFNγ	2×10^2 (n = 10)	41,7±11,7	75,5±38,4	88,3±49,1	73,2±13,8
	1×10^3 (n = 10)	42,8±10,1	102,1±24,2*	177,2±53,7*	96,7±12,1*
	5×10^3 (n = 10)	98,1±23,3*	67,7±8,7	99,7±26,6	98,2±9,3*
	$2,5 \times 10^4$ (n = 10)	105,1±25,8*	97,7±10,5*	108,1±22,6*	97,7±7,4*
	Контроль (n = 10) Control	40,8±11,8	42,6±10,3	53,5±8,8	50,7±16,6
TNFα	2×10^2 (n = 10)	72,2±1,6	73±7,4	74,5±7,1	82,4±6,5
	1×10^3 (n = 10)	71,8±2,6	88,9±6,5*	84,6±3,9	71,4±4,8
	5×10^3 (n = 10)	81,1±1,6*	86,2±3,2*	62,9±3,7	70,1±6,0
	$2,5 \times 10^4$ (n = 10)	78,3±7,1	69,6±5,4	54,9±15,7	90,2±5,4*
	Контроль (n = 10) Control	71,0±4,0	67,5±6,0	75,0±9,7	70,9±3,4
IL-4	2×10^2 (n = 10)	29,5±2,0*	27,1±2,2*	34,5±3,8	45,7±8,5
	1×10^3 (n = 10)	13,7±1,7*	21,1±0,8*	27,7±2,1*	48,3±3,9
	5×10^3 (n = 10)	25,2±4,2	39,0±3,6	43,5±4,2	59,3±3,4*
	$2,5 \times 10^4$ (n = 10)	21,6±0,8	25,1±0,7*	40,5±3,4	59,3±2,8*
	Контроль (n = 10) Control	21,4±1,9	42,4±2,1	39,5±2,2	45,8±1,8
IL-10	2×10^2 (n = 10)	84,8±6,1	12,7±0,1*	47,1±4,7*	13,6±0,3
	1×10^3 (n = 10)	69,8±2,2	13,1±0,1*	70,1±2,2	12,6±0,1
	5×10^3 (n = 10)	94,6±7,8*	16,9±1,3*	87,9±3,4	12,1±0,1
	$2,5 \times 10^4$ (n = 10)	77,8±4,9	23,4±0,8*	63,8±1,5	12,5±0,2
	Контроль (n = 10) Control	72,9±5,5	10,9±0,1	95,2±1,7	12,1±0,1
IL-17A	2×10^2 (n = 10)	9.8±1,4	8,8±0,6	17,6±0,8*	9,6±0,5*
	1×10^3 (n = 10)	9,5±1,8	9,2±1,1	13,5±0,8*	9,2±0,6*
	5×10^3 (n = 10)	13,5±1,3*	11,5±2,3*	8,5±1,6	5,1±0,2
	$2,5 \times 10^4$ (n = 10)	11,5±4,0	10,9±0,7*	6,5±0,5	4,5±0,3
	Контроль (n = 10) Control	9,4±1,0	6,5±0,5	8,2±0,7	5,4±0,7

Примечание. *p < 0,05 по сравнению с контролем.
Note. *p < 0,05 compared to control.

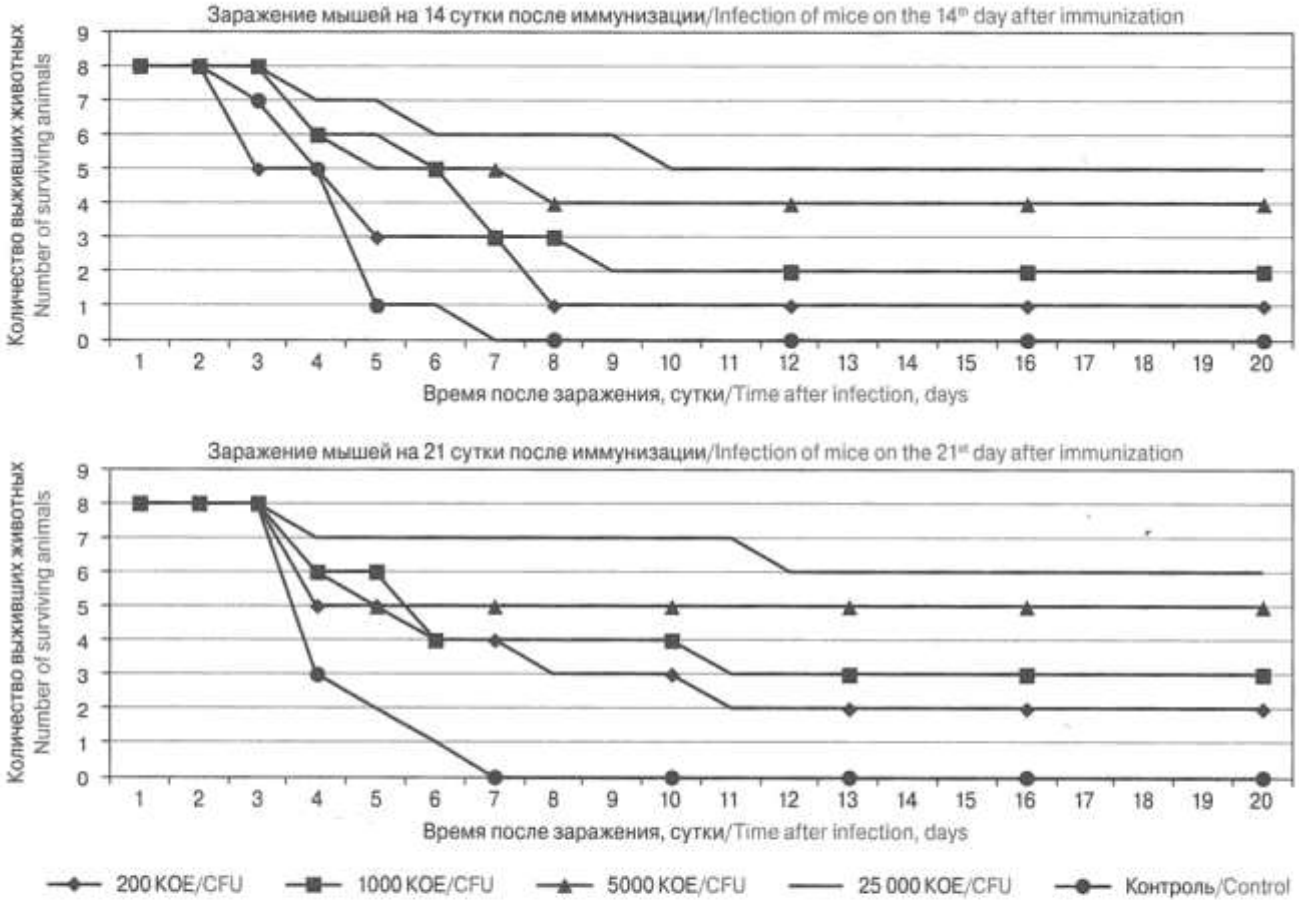

Рисунок. Выживаемость мышей линии BALB/c при подкожном заражении *Y. pestis* 231 в зависимости от иммунизирующей дозы *Y. pestis* EV НИИЭГ

Figure. Survival of BALB/c mice under subcutaneous infection with *Y. pestis* 231, depending on the immunizing dose of *Y. pestis* EV NIIEG

чения обратных титров антител к F1 чумного микроба после вакцинации достоверно не различались во все периоды наблюдения (табл. 2).

По результатам корреляционного анализа выявлена заметная взаимосвязь между титром специфических антител к капсульному антигену (F1) *Y. pestis* и уровнем IFNγ ($r = 0,75$, $p = 0,19$), однако она не являлась достоверной.

Обсуждение

Основной механизм действия вакцин — защита от инфекции — включает активацию как гуморального, так и клеточного звеньев иммунной системы, что позволяет или предотвратить развитие инфекции, или снизить риск развития тяжелого течения болезни.

Если в отношении инфекций, управляемых с помощью вакцин, четко известен иммунный показатель («защитный титр антител»), характеризующий эффективность защиты от заболевания, то в отношении чумы, к сожалению, не установлены маркеры, коррелирующие с эффективной защитой от инфекции [15]. Поэтому поиск потенциальных коррелятов защиты в модельных экспериментах с использованием животных необходим для определения маркеров эффективности специфической профилактики чумы у человека. Ранее было отмечено, что для эффективной защиты от чумы в равной мере необходима активация гуморального и клеточного звеньев иммунной системы [18, 26]. В настоящее время считается, что активация клеток, ассоциированных с продукцией ряда цитокинов (TNFα и IFNγ), обеспечивает значительную протекцию даже в отсутствие формирования специфических антител [13, 16, 17, 18]. ВОЗ для вакцин, в отношении которых не установлены четкие корреляты защиты, предлагает применять методический подход, основанный на оценке каскада цитокиновых реакций, инициируемых в ответ на прививку [19, 23]. Выявление последних на основе иммунологических данных, которые, как было установлено, статистически коррелируют с защитной эффективностью в модельном эксперименте по заражению мышей линии BALB/c, способствовало определению маркеров эффективности специфической профилактики чумы с помощью ВЧЖ.

Результаты наших экспериментов по продукции цитокинов в организме вакцинированной *Y. pestis* EV НИИЭГ биомодели свидетельствуют о значительной активации противочумного иммунитета как в фазе инициации иммунного ответа (14 сутки), так и в период окончательного формирования поствакцинального иммунитета (21 сутки). Анализ полученных данных позволил выявить ряд особенностей индуцированной продукции изученных цитокинов (IFNγ, TNFα, IL-4, IL-10, IL-17A) в зависимости от периода, прошедшего после иммунизации (14 или 21 сутки), и иммунизирующей дозы вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ. Если антиген-/митоген-индуцированная продукция IFNγ, IL-10 и IL-17A повышалась в среднем соответственно в 2,2, 1,4 и 1,6 раза, начиная с 14-х суток иммуногенеза и далее, то четкое доказательство корреляции концентрации указанных цитокинов с эффективностью защиты лабораторных животных от летальной дозы вирулентного штамма *Y. pestis* 231 продемонстрировано именно для IFNγ. Полученные результаты согласуются с данными зарубежных исследователей, определивших, что при стимуляции убитыми клетками *Y. pestis* CO92 или *Y. pestis* C12 (*Y. pestis* CO92, F1⁻) спленоцитов мышей BALB/c, подкожно иммунизированных мутантными штаммами *Y. pestis* CO92 и *Y. pestis* KIM6, наибольшую активность демонстрируют IFNγ, IL-10, IL-17A, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-13, IL-9 [13]. Кроме того, увеличение IFNγ, IL-10, IL-17A, TNFα, IL-6, IL-1β наблюдалось в Т-клетках селезенки мышей, иммунизиро-

Таблица 2. Иммунологические показатели крови добровольцев, вакцинированных живой чумной вакциной

Table 2. Immunological parameters of the blood of volunteers vaccinated with a live plague vaccine

Показатель Indicator	**Период наблюдения (месяц)** Observation period (month)	**Вакцинированные добровольцы** Vaccinated volunteers **n = 20**	**Группа сравнения** Comparison group **n = 20**
		Me (Q_{25}%–Q_{75}%)	
IFNγ, пг/мл IFNγ, pg/ml	**До вакцинации** Before vaccination	85,5 (12,8–214,2)	82,0 (71,4–92,2)
	1	159,2 (14,6–457,6)	
	6	519,9 (426,0–895,2)*	
	12	245,9 (194,6–281,7)*	
TNFα, пг/мл TNFα, pg/ml	**До вакцинации** Before vaccination	26,5 (21,7–41,7)	33,7 (27,8–54,1)
	1	67,3 (5,7–102,2)	
	6	341,9 (194,3–381,2)*	
	12	32,9 (20,4–49,7)	
IL-4, пг/мл IL-4, pg/ml	**До вакцинации** Before vaccination	2,1 (1,3–3,8)	1,8 (1,2–2,2)
	1	3,0 (2,3–6,8)	
	6	1,3 (0,6–2,0)	
	12	0,4 (0,2–0,8)	
IL-10, пг/мл IL-10, pg/ml	**До вакцинации** Before vaccination	17,4 (3,2–24,0)	22,3 (17,8–28,7)
	1	28,1 (5,4–45,8)	
	6	99,6 (42,8–158,9)*	
	12	17,8 (16,9–19,7)	
IL-17A, пг/мл IL-17A, pg/ml	**До вакцинации** Before vaccination	11,3 (1,3–28,9)	13,2 (7,6–18,5)
	1	16,8 (0,8–61,0)	
	6	116,4 (65,9–150,6)*	
	12	69,7 (36,4–80,3)*	
Обратные титры антител к F1-антигену Reverse titers of antibodies to F1 antigen	**До вакцинации** Before vaccination	0	0
	1	60 (40–80)	
	6	73,7 (40–80)	
	12	80 (40–160)	

Примечание. *p < 0,05 по сравнению с показателем до вакцинации.
Note. *p < 0,05 compared compared to before vaccination.

ванных внутримышечно *Y. pestis* CO92 (Δ lpp Δ msbB Δ ail) в ответ на рестимуляцию убитыми нагреванием клетками *Y. pestis* CO92 [21].

Установленный факт активации IL-17A и корреляция на 14 сутки иммуногенеза продукции этого цитокина с выживаемостью зараженных культурой вирулентного штамма *Y. pestis* 231 мышей также согласуется с данными зарубежных исследователей, доказавших способность IFNγ и IL-17A обеспечивать защиту мышей линии C57BL/6 от легочной чумы при полном отсутствии защитных антител после заражения вирулентными штаммами *Y. pestis* KIM D27 и *Y. pestis* CO92 [16, 17, 18].

Известна роль IL-17A и IFNγ в иммуногенезе *Y. pestis*, заключающаяся в синергическом стимулировании макрофагов, что еще раз подтверждает функцию IL-17A как внутреннего регулятора в координации антимикробной активности нейтрофилов и макрофагов при обеспечении защиты от острой легочной чумы [11].

Кроме того, кластерный анализ, основанный на изучении изменения профиля цитокинов хозяина при воздействии различными патогенами, свидетельствует об особой роли IL-10 в пато- и иммуногенезе при чуме [12].

В наших исследованиях с добровольцами, вакцинированными ВЧЖ, отмечено увеличение через 6 месяцев после прививки уровня IL-10 в 4,4 раза, а через 6–12 месяцев — уровней IFNγ и IL-17A в 3,4 и 2,8 раза соответственно. Полученные данные согласуются с клиническими исследованиями на добровольцах, показавших, что вакцинация субъединичной вакциной на основе химерного белка, объединяющего капсульный антиген (F1) и V-антигены чумного микроба и иммунодоминантную часть флагеллина *Salmonella enterica* (F1/V/Фл), индуцировала значительное увеличение количества $CD4^+$ Т-клеток и изменяла концентрацию IFNγ, TNFα, IL-10 на 14-й день после второй вакцинации [15].

Наши данные по оценке корреляционной связи между уровнем IFNγ и титром специфических антител к капсульному антигену (F1) *Y. pestis* у добровольцев соотносятся с данными об отсутствии существенных корреляций между $CD4^+$ Т-лимфоцитами, продуцирующими IFNγ, и специфическими антителами при вакцинации субъединичной вакциной F1/V/Фл [15].

Таким образом, возможными информативными коррелятами защиты мышей от чумы на 14 и 21 сутки можно считать IFNγ и IL-17A, рассматривая повышение индуцированной продукции этих цитокинов в качестве адекватных маркеров протективной эффективности иммунизации, а оценка динамики этих показателей у добровольцев, привитых ВЧЖ, позволяет считать увеличение индуцированной продукции IFNγ и IL-17A благоприятным прогностическим маркером иммунологической эффективности вакцины в период с 6-го по 12-й месяц наблюдения.

Список литературы/References

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Ленинград: Медгиз, 1962. [Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A Statistical methods in microbiological research. *Leningrad: Medgiz, 1962. (In Russ.)*]
2. Балахонов С.В., Ярыгина М.Б., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Витязева С.А., Остяк А.С., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Денисов А.В., Косилко С.А., Корзун В.М. Случай заболевания человека чумой в Кош-Агачском районе Республики Алтай в 2015 г. Сообщение 2. Микробиологическая и молекулярно-генетическая характеристика изолированных штаммов // Проблемы особо опасных инфекций. 2016. № 4. С. 51–55. [Balakhonov S.V., Yarygina M.B., Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.K., Vityazeva S.A., Ostyak A.S., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Denisov A.V., Kosilko S.A., Korzun V.M. A Case of human plague in Kosh-Agach Region of the Republic of Altai in 2015. Communication 2. Microbiological and molecular-genetic characteristics of the isolated strains. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections, 2016, no. 4, pp. 51–55. (In Russ.)*] *doi: 10.21055/0370-1069-2016-4-51-55*
3. Брико Н.И., Лобзин Ю.В., Баранов А.А., Намазова-Баранова Л.С., Ильина С.В., Королёва И.С., Харит С.М., Сидоренко С.В., Таточенко В.К., Маянский Н.А., Куличенко Т.В., Полибин Р.В., Сабитов А.У., Ковтун О.П., Романенко В.В. Оценка эффективности вакцинации: основные подходы и спорные вопросы // Педиатрическая фармакология. 2014. Т. 11, № 4. С. 8–15. [Briko N.I., Lobzin Y.V., Baranov A.A., Namazova-Baranova L.S., Il'ina S.V., Koroleva I.S., Kharit S.M., Sidorenko S.V., Tatochenko V.K., Mayanskii N.A., Kulichenko T.V., Polibin R.V., Sabitov A.U., Kovtun O.P., Romanenko V.V. Assessment of vaccination program effectiveness: basic approaches and issues. *Pediatricheskaya farmakologiya = Pediatric Pharmacology, 2014, vol. 11, no. 4, pp. 8–15. (In Russ.)*] *doi: 10.15690/pf.v11i4.1057*
4. Бугоркова С.А., Щуковская Т.Н., Микшис Н.И., Клюева С.Н., Кудрявцева О.М., Кравцов А.Л., Гончарова А.Ю., Кожевников В.А., Санджиев Д.Н., Конушева С.В., Савченко С.П., Бембеева Е.С., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Комплексное иммунологическое исследование вакцинированных живой чумной вакциной лиц, проживающих на территории Прикаспийского песчаного очага чумы в Республике Калмыкия // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2018. Т. 17, № 3. С. 38–50. [Bugorkova S.A., Shchukovskaya T.N., Mikishis N.I., Klyueva S.N., Kudryavtseva O.M., Kravtsov A.L., Goncharova A.Y., Kozhevnikov V.A., Sandzhiev D.N., Konusheva S.V., Savchenko S.P., Bembeeva E.S., Shcherbakova S.A., Kutyrev V.V. Comprehensive immunological study of persons vaccinated with live plague vaccine living on the territory of the Pre-Caspian sand foci of the plague in the republic of Kalmykia. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention, 2018, vol. 17, no. 3, pp. 38–50. (In Russ.)*] *doi: 10.31631/2073-3046-2018-17-3-38-50*

5. Клюева С.Н., Бугоркова С.А., Щуковская Т.Н., Санджиев Д.Н., Конушева С.В., Савченко С.П., Хасыкова Б.А., Щербакова С.А. Оценка уровня гуморального и клеточного иммунитета после ревакцинации против чумы лиц, проживающих на территории Прикаспийского песчаного природного очага // Медицинская иммунология. 2018. Т. 20, № 2. С. 241–250. [Klyueva S.N., Bugorkova S.A., Shchukovskaya T.N., Sandzhiev D.N., Konusheva S.V., Savchenko S.P., Khasykova B.A., Shcherbakova S.A. Assessment of the level of humoral and cellular immunity after revaccination against the plague of persons living on the territory of the Caspian sandy natural focus. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2018, vol. 20, no. 2, pp. 241–250. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-241-250*
6. Клюева С.Н., Шмелькова Т.П., Щуковская Т.Н. Влияние олигодезоксинуклеотида CpG ODN 2006 на продукцию цитокинов клетками крови людей, вакцинированных против чумы // Медицинская иммунология. 2014. Т. 16, № 6. С. 531–538. [Klyueva S.N., Shmelkova T.P., Shchukovskaya T.N. Influence of CpG ODN 2006 oligodeoxynucleotide on cytokine production by blood cells of humans vaccinated against plague. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2014, vol. 16, no. 6, pp. 531–538. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/1563-0625-2014-6-531-538*
7. Обеспечение эпидемиологического благополучия в природных очагах чумы на территории стран СНГ и Монголии в современных условиях / Под ред. А.Ю. Поповой, В.В. Кутырева. Ижевск: ООО «Издательство "Принт"», 2018. 336 с. [Ensuring epidemiological well-being in natural foci of plague on the territory of the CIS countries and Mongolia in modern conditions. Ed. by A.Yu. Popova, V.V. Kutyrev. *Izhevsk: Print Publishing House, 2018. 336 p. (In Russ.)*]
8. Самойлова Л.В. Нестерильная фаза иммунитета у животных, привитых вакциной EV // Особо опасные и природно-очаговые инфекции. 1962. С. 134–140. [Samoylova L.V. Non-sterile phase of immunity in animals vaccinated with the EV vaccine. *Osobo opasnye i prirodno-ochagovye infektsii = Particularly Dangerous and Focal Infections, 1962, pp. 134–140. (In Russ.)*]
9. Фирстова В.В., Калмантаева О.В., Горбатов А.А., Кравченко Т.Б., Тюрин Е.А., Бондаренко Н.Л., Дятлов И.А., Караулов А.В. Оценка специфического гуморального и клеточного иммунитета у людей, периодически вакцинирующихся против чумы // Иммунология, аллергология, инфектология. 2015. № 3. С. 62–68. [Firstova V.V., Kalmantaeva O.V., Gorbatov A.A., Kravchenko T.B., Tiurin E.A., Bondarenko N.L., Dyatlov I.A., Karaulov A.V. Specific humoral and cellular immunity in humans periodically vaccinated against plague. *Immunologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology, 2015, no. 3, pp. 62–68. (In Russ.)*] *doi: 10.14427/jipai.2015.3.62*
10. Щуковская Т.Н., Смолькова Е.А., Шмелькова Т.П., Клюева С.Н., Бугоркова С.А. Индуцированная продукция IFN-γ и IL-4 как показатель функциональной активности Th1- и Th2-клеток у вакцинированных против чумы людей // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2011. Т. 6, № 61. С. 78–83. [Shchukovskaya T.N., Smolkova E.A., Shmelkova T.P., Klueva S.N., Bugorkova S.A. Induced production of IFN-γ and IL-4 as an indicator of functional activity human Th1 and Th2 cells after plague vaccination. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention, 2011, vol. 6, no. 61, pp. 78–83. (In Russ.)*]
11. Bi Y., Zhou J., Yang H., Wang X., Zhang X., Wang Q., Wu X., Han Y., Song Y., Tan Y., Du Z., Yang H., Zhou D., Cui Y., Zhou L., Yan Y., Zhang P., Guo Z., Wang X., Liu G., Yang R. IL-17A produced by neutrophils protects against pneumonic plague through orchestrating IFN-γ-activated macrophage programming. *J. Immunol., 2014, vol. 192, pp. 704–713. doi: 10.4049/jimmunol.1301687*
12. Chromy B.A., Fodor I.K., Montgomery N.K., Luciw P.A., McCutchen-Maloney S.L. Cluster analysis of host cytokine responses to biodefense pathogens in a whole blood ex vivo exposure model (WEEM). *BMC Microbiology, 2012, vol. 12: 79. doi: 10.1186/1471-2180-12-79*
13. Cote C.K., Biryukov S.S., Klimko C.P., Shoe J.L., Hunter M., Rosario-Acevedo R., Fetterer D.P., Moody K.L., Meyer J.R., Rill N.O., Dankmeyer J.L., Worsham P.L., Bozue J.A., Welkos S.L. Protection elicited by attenuated live Yersinia pestis vaccine strains against lethal infection with virulent Y. pestis. *Vaccines (Basel), 2021, vol. 16, no. 9 (2): 161. doi: 10.3390/vaccines9020161*
14. Ehrenkranz N.J., Meyer K.F. Studies on immunization against plague. VIII. Study of three immunizing preparations in protecting primates against pneumonic plague. *J. Infect. Dis., 1955, no. 96, pp. 138–144. doi: 10.1093/infdis/96.2.138*
15. Hamzabegovic F., Goll J.B., Hooper W.F., Frey S., Gelber C.E., Abate G. Flagellin adjuvanted F1/V subunit plague vaccine induces T cell and functional antibody responses with unique gene signatures. *NPJ Vaccines, 2020, vol. 5, no. 1: 6. doi: 10.1038/s41541-020-0156-y*
16. Kummer L.W., Szaba F.M., Parent M.A., Adamovicz J.J., Hill J., Johnson L.L., Smiley S.T. Antibodies and cytokines independently protect against pneumonic plague. *Vaccine, 2008, vol. 26, no. 52, pp. 6901–6907. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.09.063*
17. Lin J.S., Kummer L.W., Szaba F.M., Smiley S.T. IL-17 contributes to cell-mediated defense against pulmonary Yersinia pestis infection. *J. Immunol., 2011, vol. 186, no. 3, pp. 1675–1684. doi: 10.4049/jimmunol.1003303*
18. Lin J.S., Park S., Adamovicz J.J., Hill J., Bliska J.B., Cote C.K., Perlin D.S., Amemiya K., Smiley S.T. Affiliations TNFα and IFNγ contribute to F1/LcrV-targeted immune defense in mouse models of fully virulent pneumonic plague. *Vaccine, 2010, vol. 29, no. 2, pp. 357–362. doi: 10.1016/j.vaccine. 2010.08.099*
19. Plotkin S.A. Correlates of protection induced by vaccination. *Clin. Vaccine Immunol., 2010, vol. 17, no. 7, pp. 1055–1065. doi: 10.1128/CVI.00131-10*
20. Sagiyev Z., Berdibekov A., Bolger T., Merekenova A., Ashirova S., Nurgozhin Z., Dalibayev Z. Human response to live plague vaccine EV, Almaty region, Kazakhstan, 2014–2015. *PLoS One, 2019, vol. 14, no. 6: e0218366. doi: 10.1371/journal.pone.0218366*
21. Tiner B.L., Sha J., Ponnusamy D., Baze W.B., Fitts E.C., Popov V.L., van Lier C.J., Erova T.E., Chopra A.K. Intramuscular immunization of mice with a live-attenuated triple mutant of Yersinia pestis CO92 induces robust humoral and cell-mediated immunity to completely protect animals against pneumonic plague. *Clin. Vaccine Immunol., 2015, vol. 22, no. 12, pp. 1255–1268. doi: 10.1128/CVI.00499-15*
22. Wang X., Singh A.K., Zhang X., Sun W. Induction of protective antiplague immune responses by self-adjuvanting bionanoparticles derived from engineered Yersinia pestis. *Infect Immun., 2020, vol. 88, no. 5: e00081-20. doi: 10.1128/IAI.00081-20*
23. WHO. Correlates of vaccine-induced protection: methods and implications. *Geneva: WHO, 2013. 65 p.*

24. Williamson E.D., Flick-Smith H.C., Waters E., Miller J., Hodgson I., Le Butt C.S., Hill J. Immunogenicity of the rF1+rV vaccine for plague with identification of potential immune correlates. *Microb. Pathog., 2007, vol. 42, no. 1, pp. 11–21. doi: 10.1016/j.micpath.2006.09.003*
25. Zauberman A., Cohen S., Levy Y., Lazar S., Velan B., Shafferman A., Flashner Y., Mamroud E. Neutralization of Yersinia pestis-mediated macrophage cytotoxicity by anti-LcrV antibodies and its correlation with protective immunity in a mouse model of bubonic plague. *Vaccine, 2008, vol. 26, no. 13, pp. 1616–1625. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.01.033*
26. Zvi A., Rotem S., Zauberman A., Elia U., Aftalion M., Bar-Haim E., Mamroud E., Cohen O. Novel CTL epitopes identified through a Y. pestis proteome-wide analysis in the search for vaccine candidates against plague. *Vaccine, 2017, vol. 35, no. 44, pp. 5995–6006. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.05.09*

Авторы:
Клюева С.Н., к.б.н., научный сотрудник отдела иммунологии ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», г. Саратов, Россия;
Бугоркова С.А., д.м.н., зав. отделом иммунологии ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», г. Саратов, Россия;
Каштанова Т.Н., младший научный сотрудник отдела иммунологии ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», г. Саратов, Россия.

Authors:
Klyueva S.N., PhD (Biology), Researcher, Department of Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;
Bugorkova S.A., PhD, MD (Medicine), Head of the Department of Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;
Kashtanova T.N., Junior Researcher, Department of Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation.

Поступила в редакцию 20.05.2021
Принята к печати 08.11.2021

Received 20.05.2021
Accepted 08.11.2021

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2022, vol. 12, no. 2, pp. 263–270

Инфекция и иммунитет
2022, Т. 12, № 2, с. 263–270

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ микроРНК В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЛЕГКИХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ЗАРАЖЕНИИ ВИРУСОМ ГРИППА И ОБРАБОТКЕ РНКазой

И.А. Байчурина, М.И. Маркелова, Р. Шах Махмуд

ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия

Резюме. Вирус гриппа способен вызывать острую респираторную инфекцию, которая ежегодно затрагивает от 5 до 20% человеческой популяции. Распространение эпидемии вируса гриппа происходит за короткое время из-за высокого уровня контагиозности. Помимо этого, ежегодная циркуляция вируса среди домашнего скота и водоплавающих птиц увеличивает риск зоонозной передачи новых штаммов в человеческую популяцию, у которой ранее не был сформирован иммунитет. Кроме того, в прошлом появилось несколько пандемических штаммов с высокой вирулентностью, и постоянно присутствует угроза возникновения нового пандемического штамма. Идентификация физиологических и молекулярных аспектов гриппа А может помочь в разработке терапевтических подходов для снижения побочных эффектов, связанных с заболеванием, вызванным этим вирусом. Профиль РНК в клетках человека изменяется после воздействия вируса гриппа. В настоящее время ученые все чаще уделяют внимание исследованию молекул микроРНК, которые способны регулировать экспрессию генов. Таким образом, микроРНК способны играть решающую роль в широком спектре биологических процессов, и ранее было показано, что они являются важными эффекторами в сложных сетях взаимодействия «хозяин–патоген». Изучение количественного и качественного состава микроРНК является важным инструментом для диагностики и лечения различных заболеваний на ранней стадии. Целью работы является анализ профиля микроРНК для изучения воздействия вируса гриппа А (H1N1) на эпителиальные клетки аденокарциномы легких человека. Фракция микроРНК была получена с помощью фенол-хлороформной экстракции и проанализирована с помощью высокопроизводительного секвенирования на платформе SOLiD 550xl wildfire и биоинформатических методов. В работе было исследовано 129 зрелых микроРНК из неинфицированных клеток, обработанных РНКазой *Bacillus pumilus* и клеток, инфицированных вирусом гриппа А (H1N1). Установлено, что в неинфицированных клетках, обработанных РНКазой, присутствует в 2 раза больше различных микроРНК, которые могут участвовать в подавлении канцерогенеза. Наибольшая экспрессия в клетках, инфицированных вирусом гриппа, наблюдается для miR-6884-5p. Для клеток,

Адрес для переписки:
Байчурина Ирина Алексеевна
420008, Россия, г. Казань, ул. Кремлевская, 18,
ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет.
Тел.: 8 950 327-70-39.
E-mail: letovaira1995@mail.ru

Contacts:
Irina A. Baichurina
420008, Russian Federation, Kazan, Kremlevskaya str., 18,
Kazan (Volga Region) Federal University.
Phone: +7 950 327-70-39.
E-mail: letovaira1995@mail.ru

Для цитирования:
Байчурина И.А., Маркелова М.И., Шах Махмуд Р. Сравнительный анализ экспрессии микроРНК в эпителиальных клетках легких человека при заражении вирусом гриппа и обработке РНКазой // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 2. С. 263–270. doi: 10.15789/2220-7619-ACA-1454

Citation:
Baichurina I.A., Markelova M.I., Shah Mahmud R. A comparative analysis of miRNA expression in human lung epithelial cells during infection with influenza virus and RNAse treatment // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 2, pp. 263–270. doi: 10.15789/2220-7619-ACA-1454

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности 0671-2020-0058. Часть работы выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030). Исследование проводилось на оборудовании Междисциплинарного центра коллективного пользования ресурсов Казанского федерального университета.

This work was funded by the subsidy allocated to Kazan Federal University for the state assignment in the sphere of scientific activities 0671-2020-0058. This paper has been supported by the Kazan Federal University Strategic Academic Leadership Program (PRIORITY-2030). The research was performed using the equipment of the Interdisciplinary Center for Shared Use of the Kazan Federal University.

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-ACA-1454

обработанных РНКазой, наибольшая экспрессия наблюдается для miR-3923, практически в 400 раз больше, чем в клетках, зараженных вирусом гриппа. Мы предполагаем, что интактные вирусы или их внутриклеточные компоненты способны изменять клеточный метаболизм в сторону снижения устойчивости к процессам канцерогенеза.

Ключевые слова: *микроРНК, клетки эукариот, вирус гриппа, рак, биомаркер, секвенирование.*

A COMPARATIVE ANALYSIS OF miRNA EXPRESSION IN HUMAN LUNG EPITHELIAL CELLS DURING INFECTION WITH INFLUENZA VIRUS AND RNAse TREATMENT

Baichurina I.A., Markelova M.I., Shah Mahmud R.

Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russian Federation

Abstract. The influenza virus is capable of causing an acute respiratory infection that affects 5 to 20% of the human population annually. The spread of the influenza virus epidemic occurs within a short period of time due to its high contagiousness. In addition, the annual circulation of the virus among livestock and waterfowl increases for new strains a risk of zoonotic transmission to human populations with unestablished yet immunity. In addition, several high virulence pandemic strains have emerged in the past, and the threat of a new pandemic strain is constantly present. The identification of the physiological and molecular aspects related to influenza A can help developing therapeutic approaches to lower side effects associated with the disease caused by this virus. The RNA profile in human cells changes after exposure to influenza virus. Currently, scientists have been increasingly paying attention to study of microRNAs capable of regulating gene expression. Thus, microRNAs may play a critical role in a wide range of biological processes and have been previously shown to be important effectors in multilayered host-pathogen interplay. The study of the quantitative and qualitative miRNA composition is an important tool for diagnosing and treating various diseases at an early stage. The aim of this work is to analyze the microRNA profile for investigating an effect of influenza A (H1N1) virus on human lung epithelial adenocarcinoma cells. The microRNA fraction was isolated by using phenol-chloroform extraction and analyzed with high-throughput sequencing on the SOLiD 550xl wildfire platform using bioinformatic methods. The study examined 129 mature microRNAs from uninfected cells treated with *Bacillus pumilus* RNAse as well as cells infected with the influenza A (H1N1) virus. It was found that uninfected cells treated with RNase contained 2-fold more different microRNAs that can participate in suppressing carcinogenesis. The peak expression in influenza virus-infected cells is observed for miR-6884-5p. For cells treated with RNase, the peak expression is observed for miR-3923 that was higher by 400-fold than in cells infected with the influenza virus. We hypothesize that intact viruses or their intracellular components are able to alter cellular metabolism by skewing it to decreased resistance to carcinogenesis processes.

Key words: *microRNA, eukaryotic cells, influenza virus, cancer, biomarker, sequencing.*

Введение

Последние 20 лет малые некодирующие РНК (нкРНК) находятся в центре внимания многих исследований. Некодирующие РНК относятся к транскриптам, которые не подвергаются дальнейшей трансляции. В настоящее время участие малых нкРНК в различных заболеваниях человека широко изучено [23]. Анализ малых нкРНК имеет большое значение, так как многие из них играют решающую роль в различных биологических процессах [6]. Одним из классов нкРНК является микроРНК — класс коротких консервативных 5′-фосфорилированных РНК, длина которых составляет 19–24 нуклеотида. Главной функцией микроРНК является посттранскрипционная регуляция экспрессии генов. Пострегуляция транскрипции мРНК играет важную роль для поддержания оптимального баланса белков в клетках, что необходимо для нормального функционирования организма [21].

Молекулы микроРНК рассматривают в качестве биомаркеров благодаря их стабильности и специфичности. Анализ микроРНК как биомаркера является неинвазивным, чувствительным и специфичным к заболеваниям, позволяет определить болезнь на ранних этапах, чувствителен к течению болезни и терапии [8].

На сегодняшний день нет полного понимания молекулярных механизмов, запускаемых с помощью микроРНК в клетках, которые инфицированы вирусом гриппа А. Ранее в исследованиях были получены противоречивые результаты: с одной стороны, внутриклеточные микроРНК могут ингибировать репликацию вирусов, а с другой, у некоторых вирусов, включая IAV, появились механизмы, которые позволяют избегать ингибирующего действия микроРНК хозяина [30]. Lin и соавт. изучили механизм микроРНК-индуцированной репрессии иммунного ответа, в реакции с белком вируса птичьего гриппа А (H9N2) [18]. МикроРНК miR-

674 и miR-155 влияют на активацию дендритных клеток иммунной системы в ответ на белок вируса А (H9N2). Авторами установлено, что ингибирование miR-674 или miR-155 значительно повышало репликацию вируса H9N2. Избыточная экспрессия miR-674 или miR-155 ингибировала репликацию вируса птичьего гриппа [18]. МикроРНК играют важную роль в регуляции клеточного цикла (miR-34c, miR-138, miR-139b), отвечают за индукцию врожденного иммунитета (let-4f, miR-146b, miR-192, miR-223, miR-451), участвуют в развитии В- и Т-лимфоцитов (miR-34c, miR-181a). Известно, что miR-323, miR-491, miR-654 и miR-let-7c могут подавлять экспрессию вирусных генов и ингибировать репликацию вируса H1N1 *in vitro* [22].

При раке часто нарушается экспрессия микроРНК. МикроРНК подразделяются на онкогенные (онкомикроРНК), способствующие развитию рака, и супрессорные, подавляющие онкологический процесс. Некоторые микроРНК могут играть двойную роль и оказывать онкогенный эффект при одном типе опухолей и супрессирующий — при другом типе рака [20]. Было установлено, что miR-3923 может негативно регулировать экспрессию протоонкогена KRAS и соответствующих белков. Ингибирование miR-3923 активирует онкогенный KRAS-путь. При раке поджелудочной железы наблюдается снижение miR-3923. Сверхэкспрессия miR-3923 ингибирует рост опухоли и метастазы в печени *in vivo*. Известно, что экспрессия miR-3923 значительно снижается в тканях рака поджелудочной железы и рака молочной железы [16, 29]. Сверхэкспрессия miR-3923 снижает инвазивную способность клеток рака [29]. Ранее было установлено, что РНКаза *B. pumilus* взаимодействует с эндогенным KRAS. После обработки РНКазой лейкозных клеток было отмечено увеличение экспрессии 62 генов, связанных с апоптозом. РНКаза *B. pumilus* ингибировала пролиферацию RAS трансформированных фибробластов. О.Н. Ильинская и соавт. предположили, что апоптоз в опухолевых клетках может происходить вследствие взаимодействия между биназой и KRAS [10]. Изучение функций микроРНК в регуляции иммунитета при раке играет важную роль для последующего выяснения механизмов, которые приведут к открытию новых методов лечения онкологических заболеваний [11].

Ранее была выдвинута гипотеза о том, что иммунитет и иммунная память против антигенов, ассоциированных с опухолью, не появляются *de novo* на опухолевых клетках или предраковых областях, а образуются в более раннем возрасте в ответ на вирусные и другие инфекции [9]. Несколько крупных эпидемиологических исследований показали, что у лиц с фебрильными детскими инфекциями в анамнезе снижался риск различных видов рака в течение жизни. Механизмы, лежащие в основе этой защитной функции, неизвестны [9]. В работе И. Кузнецовой и соавт. [14] было показано, что мыши, которые перенесли инфекции, вызванные двумя разными вирусами гриппа, лучше контролируют рост перевиваемых опухолей легких.

Актуальным направлением в противораковой терапии является разработка онколитических вирусов. Онколитические вирусы избирательно размножаются в опухолевой ткани и уничтожают ее, не вызывая повреждения здоровых тканей [24]. В работе И. Кузнецовой и соавт. [14] был разработан онколитический вирус на основе аттенуированного вируса гриппа А (IAV). Авторы работы исследовали способность созданного онколитического вируса реплицироваться в опухолевых клетках и оказывать онколитический эффект *in vivo*. В результате внутриопухолевое применение сгенерированного вируса оказывало положительный терапевтический эффект [14]. Исследователи создают онколитические вирусы на основе аденовирусов [31]. Авторы ожидают, что синтезированный вирус, который получил название dl355, будет избирательно реплицироваться в раковых клетках. В исследовании был сделан вывод о том, что способность репликации в dl355 в раковых клетках заметно увеличена по сравнению с нормальными клетками [31].

Заболеваемость и смертность у детей, получающих терапию от рака, могут быть обусловлены гриппом [12]. У детей с онкологическими заболеваниями, которые заболели гриппом, по сравнению со здоровыми людьми, наблюдалось увеличение длительности и тяжести заболевания [5]. Несмотря на то, что заболевание гриппом у детей с раком явление редкое, оно требует повышенного внимания [26]. Грипп у онкобольных детей может приводить к респираторным осложнениям в виде пневмоний и сепсису. При наличии инфекции вируса гриппа могут возникать противопоказания к использованию противораковой терапии [26].

Биназа — это бактериальная экзогенная рибонуклеаза из бактерии *Bacillus pumilus*. Ранее было показано, что биназа обладает противовирусной активностью и снижает титр вируса гриппа А (H1N1) pdm09 в клетках линии A549 при нетоксичных концентрациях [27]. Внеклеточные бактериальные рибонуклеазы, в том числе биназа, обладает противоопухолевой активностью при определенных концентрациях. Биназа обладает большим потенциалом в качестве и противоопухолевого, и противовирусного препарата [19].

Целью работы было изучение профиля микроРНК при воздействии вируса гриппа А (H1N1) или РНКазы на эпителиальные клетки легких человека с диагнозом аденокарцинома.

Материалы и методы

Подготовка клеточной культуры. В работе были использованы эпителиальные клетки легких человека с диагнозом аденокарцинома легких линии A549. Использовали клетки, которые заражали пандемическим вирусом гриппа A/Humburg/04/09 (H1N1pdm) (Av), и неинфицированные клетки, обработанные противовирусным препаратом РНКазой (Ad). Заражение проводили после двукратного отмывания клеток фосфатным буфером (Sigma Aldrich, США) содержащим 1 mM $MgCl_2$, 0,9 mM $CaCl_2$, 100 Ед/мл пенициллина и 0,1 мг/мл стрептомицина. Добавляли 0,5 мл суспензии с вирусом на клетки с последующим инкубированием в темноте при комнатной температуре. Через 1 ч суспензию с вирусом гриппа удаляли с добавлением свежей среды [25]. Обработанные РНКазой и зараженные вирусом гриппа клетки выращивали в 6-луночном планшете, содержащем среду Игла с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (PAA, Австрия), 100 Ед/мл пенициллина и 0,1 мг/ мл стрептомицина (P/S) (Gibco, США). Клетки инкубировали в течение 12 ч при температуре 37°C, 5% CO_2 и 95% атмосферы.

Выделение тотальной РНК. Тотальную РНК из клеток выделяли с помощью реагента TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific, США), клетки в количестве 10^6 растворяли в 1 мл реагента. Затем выделяли тотальную РНК по методу Хомчинского [7] в соответствии с инструкцией производителя TRIzol Reagent. В пробирку, содержащую тотальную РНК клеток, добавляли по 50 мкл воды без РНКаз (Life Technologies, США) [1].

Выделение микроРНК из фракции тотальной РНК. Для выделения малых РНК из тотальной РНК клеток, использовали магнитные частицы Agencourt AMPure XP Reagent beads (Beckman Coulter, США). В пробирку добавили образец тотальной РНК и инкубировали при 70°C в течение 2 мин. Затем добавили 0,5 объема магнитных частиц в горячий образец. Устанавливали пробирку в магнитный штатив, переносили прозрачный раствор в новую пробирку. Далее очищали с помощью 0,5 мл изопропанола, центрифугировали в течение 30 мин при 4°C, 20 000g. Аккуратно удаляли надосадочную жидкость, добавляли 1 мл свежеприготовленного 75% этанола и центрифугировали в течении 60 мин при 20 000g и 4°C. Удаляли супернатант и оставляли сушиться пробирки на столе с открытой крышкой в течение 15 мин, затем растворяли РНК в 50 мкл воды без РНКаз.

Подготовка библиотеки для секвенирования. Для приготовления библиотеки малых РНК с последующим секвенированием использовали SOLiD Total RNA-Seq Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Провели реакции гибридизации и лигирования адаптеров с выделенными матрицами микроРНК с помощью компонентов набора SOLiD Total RNA-Seq Kit. Осуществили реакцию обратной транскрипции со смесью после лигирования, используя компоненты набора для секвенирования. Выполнили реакцию амплификации, используя компоненты набора SOLiD Total RNA-Seq Kit, чтобы увеличить количество кДНК и ДНК необходимого размера. Провели очистку полученной ДНК от ПЦР-продуктов с помощью коммерческого набора PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen, США), после чего — реакцию конверсии. Секвенирование выполняли на приборе SOLiD 5500xl wildfire next generation sequencer (Thermo FisherScientific, США).

Анализ количества и состава фракций РНК в образцах. Количественный анализ РНК, выделенной из эпителиальных клеток легких че-

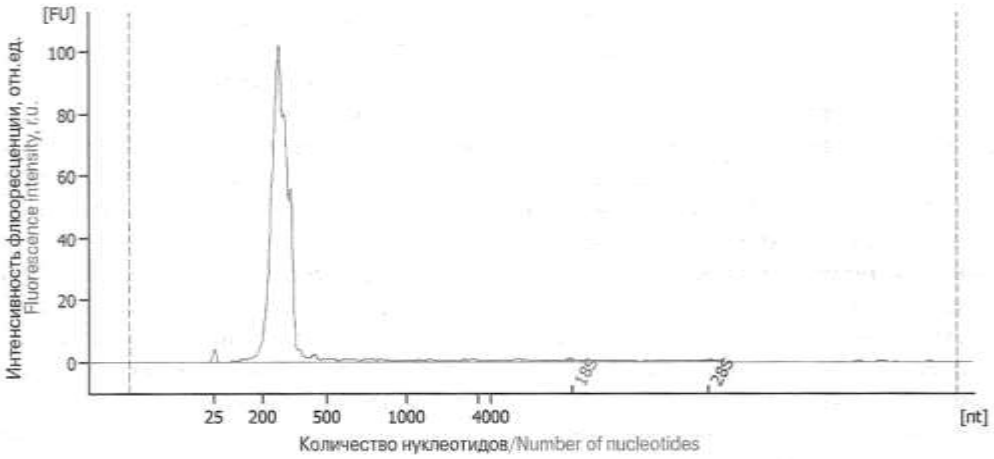

Рисунок 1. Анализ размера РНК эпителиальных клеток легких человека, полученных с использованием магнитных частиц и последующей термообработкой

Figure 1. RNA size analysis of human lung epithelial cells obtained by using magnetic particles and subsequent heat treatment

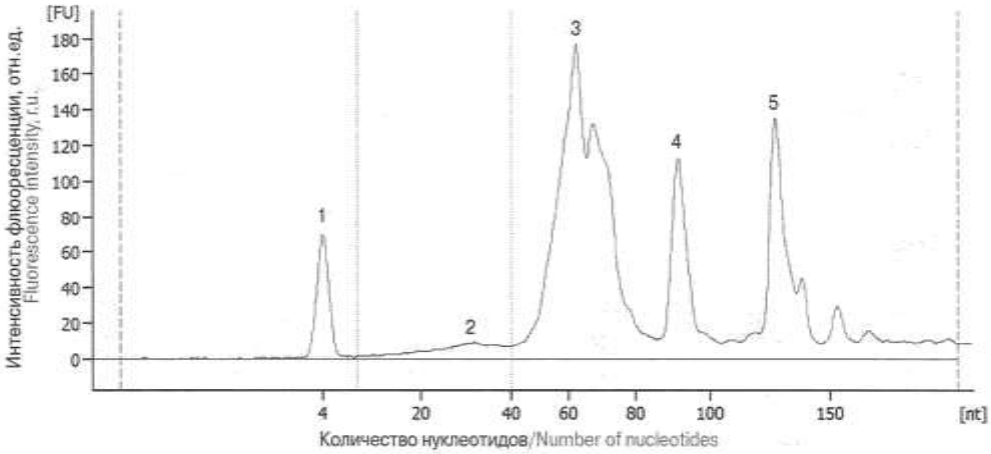

Рисунок 2. Анализ размера выделенных малых РНК с использованием магнитных частиц с последующей термообработкой

Figure 2. Size analysis of isolated small RNAs by using magnetic particles followed by heat treatment

Примечание. 1 — маркер, 2 — микроРНК, 3 — тРНК, 4 — 5S рРНК, 5 — 5.8S рРНК.

Note. 1 — (size) marker, 2 — microRNA, 3 — tRNA, 4 — 5S rRNA, 5 — 5.8S rRNA.

ловека, проводили с помощью флуориметрического метода на приборе Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, США). Для анализа размера тотальной РНК использовали реагенты Agilent RNA 6000 Pico/Nano Kit (Agilent Technologies, США). Состав микроРНК изучали с применением набора реагентов Agilent Small RNA Kit (Agilent Technologies, США). Для анализа качества полученной библиотеки для секвенирования использовали Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies, США). Измерения проводили на приборе Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, США) по инструкции производителя.

Биоинформатический и статистический анализ. Полученные прочтения были картированы на референсную базу данных микроРНК miRBase v. 21 [13] с помощью программы Bowtie [15]. Подсчет количества картированных ридов на каждую микроРНК был произведен с помощью featureCounts [17], дифференциальная экспрессия считалась в среде R с помощью пакета DESeq [3].

Результаты

В работе была получена фракция микроРНК с помощью отбора по размерам с использованием магнитных частиц. Этот метод является эффективным для получения малых РНК (до 400 нуклеотидов) из внутриклеточной тотальной РНК (рис. 1).

На рис. 2 показана фракция малых некодирующих РНК размером до 150 нуклеотидов. В этот диапазон размеров входят различные классы малых РНК, в том числе и микроРНК.

В работе установлено, что в клетках, зараженных вирусом гриппа А (H1N1), наибольшую экспрессию имеет miR-6884-5p (рис. 3). На сегодняшний день для miR-6884-5p мишени еще не обнаружены, поэтому функции данной микроРНК остаются неизвестными.

Обсуждение

Известно, что в клетках до 30% генов регулируются с помощью микроРНК [2]. Можно выстроить цепь воздействия микроРНК на организм человека: организм реагирует на внешние изменения регуляцией экспрессии микроРНК, затем микроРНК воздействует на мРНК-мишень, которая участвует в трансляции белков, которые в свою очередь оказывают влияние на адаптацию организма к меняющимся условиям. В работе было обнаружено 62 и 67 зрелых микроРНК клеток после обработки препаратом и в клетках после заражения вирусом гриппа

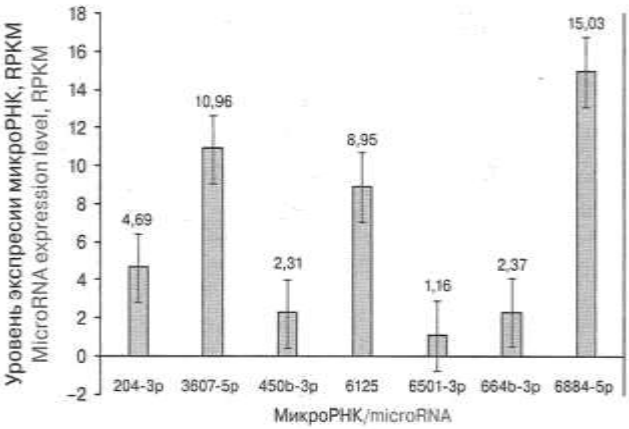

Рисунок 3. Экспрессия различных микроРНК в клетках, зараженных вирусом гриппа

Figure 3. Expression of various miRNAs in cells infected with influenza virus

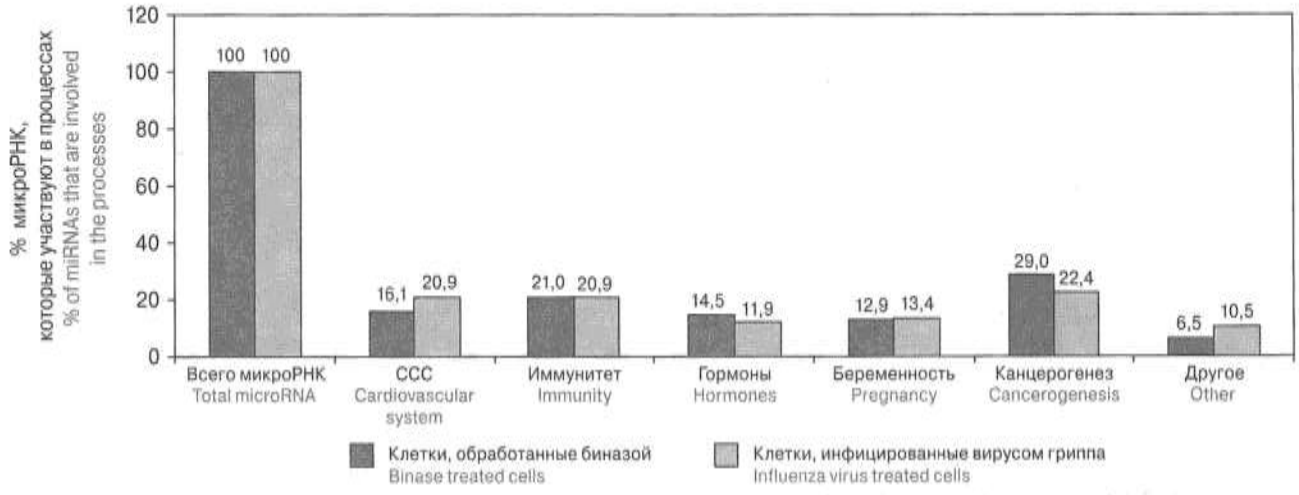

Рисунок 4. Количественное распределение различных видов микроРНК в организме человека

Figure 4. The quantitative distribution of various types of miRNAs in the human body

соответственно. На рис. 4 показано количественное распределение зрелых микроРНК, которые принимают участие в различных процессах в организме человека, данные получены с помощью баз данных mirBase, mirDB и NCBI. Наибольшую долю всех обнаруженных микроРНК занимают микроРНК, которые участвуют в канцерогенезе. На их долю приходится 29 и 22,4% в клетках, обработанных биназой, и в клетках, инфицированных вирусом гриппа, соответственно (рис. 4).

Известно, что нарушения экспрессии микроРНК могут приводить к развитию онкологических заболеваний [21]. Было установлено, что количество разных зрелых микроРНК, которые функционируют как репрессоры канцерогенеза, в 2 раза увеличивается в неинфицированных клетках, обработанных препаратом, по сравнению с вирус-зараженными клетками (рис. 5). В клетках, зараженных вирусом гриппа, увеличивается количество онкогенных микроРНК. Установлено, что эти микроРНК участвуют в развитии рака молочной железы и рака легких. Ранее было установлено [4, 28], что в поджелудочной железе количество онкомаркеров снижается в связи с тем, что в поджелудочной железе присутствует панкреатическая рибонуклеаза, которая подавляет канцерогенез. В нашей работе рибонуклеаза бактериального происхождения, подавляя определенные микроРНК, репрессирует образование рака, однако механизм ее действия еще предстоит изучить.

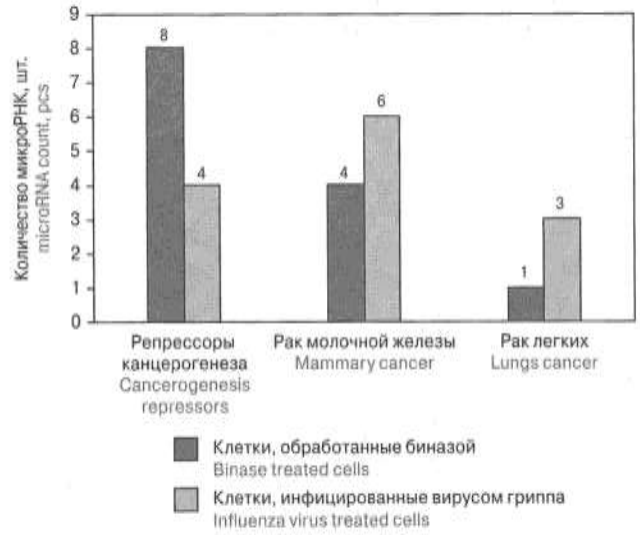

Рисунок 5. Количественный анализ микроРНК, участвующих в канцерогенезе

Figure 5. Quantitative analysis of microRNAs involved in carcinogenesis

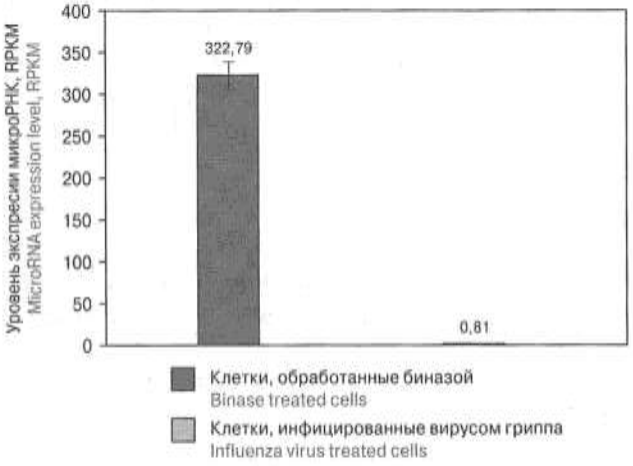

Рисунок 6. Экспрессия miR-3923 в клетках, обработанных биназой, и в клетках, зараженных вирусом

Figure 6. The expression of miR-3923 in cells binase-treated and virus-infected cells bolites influence on dermal human fibroblasts viability

Наибольшая экспрессия в клетках, обработанных препаратом биназы, обнаружена для miR-3923 (рис. 6). У данной микроРНК (miR-3923) 215 мишеней, в том числе гены, которые отвечают за развитие аденокарциномы легкого, острого миелоидного лейкоза и колоректальной карциномы, также miR-3923 экспрессируется в инфицированных вирусом клетках. Количество miR-3923 в клетках, зараженных вирусом гриппа, практически в 400 раз меньше, чем в неинфицированных клетках, обработанных РНКазой. Из литературных данных [16, 29] известно, что сверхэкспрессия miR-3923 ингибирует рост опухоли и метастазирование различных типов рака. Так как наблюдалось снижение экспрессии микроРНК miR-3923, мы выдвигаем предположение, что клетки, зараженные вирусом гриппа, обладают меньшей устойчивостью к канцерогенезу.

Заключение

1. Установлено, что в клетках линии A549, зараженных вирусом гриппа, увеличивается количество микроРНК, мишенями которых могут выступать онкогенные белки. При обработке клеток аденокарциномы легких человека РНКазой количество микроРНК, мишенями которых являются мРНК с функцией подавления канцерогенеза, увеличивается.

2. В клетках, инфицированных вирусом гриппа A (H1N1), наибольшая экспрессия наблюдается для miR-6884-5p. В клетках, обработанных РНКазой, экспрессия микроРНК miR-3923 почти в 400 раз выше, чем в клетках, инфицированных вирусом гриппа, одной из мишеней данной микроРНК является белок, который участвует в сдерживании процессов канцерогенеза.

Список литературы/References

1. Летова И.А., Мадумаров С.А., Сысоева М.А., Шах Махмуд Р.З. Ускоренный и эффективный метод выделения микроРНК из плазмы крови человека // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2019. Т. 9, № 1. С. 53–59. [Letova I.A., Madumarov S.A., Sysoyeva M.A., Shah Mahmud R.Z. Accelerated and efficient method for isolating microRNA from human blood plasma. *Izvestiya vuzov. Prikladnaya khimiya i biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 53–59. (In Russ.)] doi: 10.21285/2227-2925-2019-9-1-53-59*
2. Макарова Ю.А., Крамеров Д.А. Некодирующие РНК // Биохимия. 2007. Т. 72, № 11. С. 1427–1448. [Makarova Yu.A., Kramerov D.A. Non-coding RNA. *Biokhimiya = Biochemistry, 2007, vol. 72, no. 11, pp. 1427–1448. (In Russ.)*]
3. Anders S., Huber W. Differential expression of RNA-Seq data at the gene level — the DESeq package. *Heidelberg: European Molecular Biology Laboratory (EMBL), 2012, p. 24.*
4. Boudouresque F., Siret C., Dobric A., Silvy F., Soubeyran P., Iovanna J., Lombardo D., Berthois Y. Ribonuclease MCPiP1 contributes to the loss of micro-RNA-200 family members in pancreatic cancer cells. *Oncotarget, 2018, vol. 9, no. 89, pp. 35941–35961. doi: 10.18632/oncotarget.26310*
5. Carr S.B., Adderson E.E., Hakim H., Xiong X.P., Yan X.W., Caniza M. Clinical and demographic characteristics of seasonal influenza in pediatric patients with cancer. *Pediatr. Infect. Dis. J., 2012, vol. 31, no. 11, pp. 202–207. doi: 10.1097/INF.0b013e318267f7d9*
6. Chen C.J., Heard E. Small RNAs derived from structural non-coding RNAs. *Methods, 2013, vol. 63, no. 1, pp. 76–84. doi: 10.1016/j.ymeth.2013.05.001*
7. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction. *Anal. Biochem., 1987, vol. 162, no. 1, pp. 156–159. doi: 10.1016/0003-2697(87)90021- 2*
8. Correia C.N., Nalpas N.C., McLoughlin K.E., Browne J.A., Gordon S.V., MacHugh D.E., Shaughnessy R.G. Circulating microRNAs as potential biomarkers of infectious diseases. *Front. Immunol., 2017, vol. 8: 118. doi: 10.3389/fimmu.2017.00118*
9. Iheagwara U.K., Beatty P.L., Van P.T., Ross T.M., Minden J.S., Finn O.J. Influenza virus infection elicits protective antibodies and T cells specific for host cell antigens also expressed as tumor associated antigens: a new view of cancer immunosurveillance. *Cancer Immunol. Res., 2014, vol. 2, no. 3, pp. 263–273. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13- 0125*
10. Ilinskaya O.N., Singh I., Dudkina E., Ulyanova V., Kayumov A., Barreto G. Direct inhibition of oncogenic KRAS by Bacillus pumilus ribonuclease (binase). *Biochim. Biophys. Acta, 2016, vol. 1863, pp. 1559–1567. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.04.005*
11. Jadideslam G., Ansarin K., Sakhinia E., Babaloo Z., Abhari A., Ghahremanzadeh K., Khalili M., Radmehr R., Kabbazi A. Diagnostic biomarker and therapeutic target applications of miR-326 in cancers: a systematic review. *J. Cell. Physiol., 2019, vol. 234, no. 12, pp. 21560–21574. doi: 10.1002/jcp.28782*
12. Kotecha R.S., Wadia U.D., Jacoby P., Ryan A.L., Blyth C.C., Keil A.D., Gottardo N.G., Cole C.H., Barr I.G., Richmond P.C. Immunogenicity and clinical effectiveness of the trivalent inactivated influenza vaccine in immunocompromised children undergoing treatment for cancer. *Cancer Med., 2016, vol. 5, no. 2, pp. 285–293. doi: 10.1002/cam4.596*
13. Kozomara A., Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res., 2014. vol. 42, no. D1, pp. 68–73. doi: 10.1093/nar/gkt1181*
14. Kuznetsova I., Arnold T., Aschacher T., Schwager C., Hegedus B., Garay T., Stukova M., Pisareva M., Pleschka S., Bergmann M., Egorov A. Targeting an oncolytic influenza A virus to tumor tissue by elastase. *Mol. Ther. Oncolytics, 2017, vol. 7, pp. 37–44. doi: 10.1016/j.omto.2017.09.002*
15. Langmead B. Aligning short sequencing reads with Bowtie. *Curr. Protoc. Bioinform., 2010, vol. 11: 11.7. doi: 10.1002/0471250953.bi1107s32*
16. Li X., Deng S.J., Zhu S., Jin Y., Cui S.P., Chen J.Y., Xiang C., Li Q.Y., He C., Zhao S.F., Chen H.Y., Niu Y., Liu Y., Deng S.C., Wang C.Y., Zhao G. Hypoxia-induced lncRNA-NUTF2P3-001 contributes to tumorigenesis of pancreatic cancer by derepressing the miR-3923/KRAS pathway. *Oncotarget, 2016, vol. 7, pp. 6000–6014. doi: 10.18632/oncotarget.6830*

17. Liao Y., Smyth G.K., Shi W. Feature counts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics, 2014, vol. 30, no. 7, pp. 923–930. doi: 10.1093/bioinformatics/btt656*
18. Lin J., Chen Y. T., Xia J., Yang Q. MiR674 inhibits the neuraminidase-stimulated immune response on dendritic cells via downregulated Mbnl3. *Oncotarget, 2016, vol. 7, no. 31, pp. 48978–48994. doi: 10.18632/oncotarget.9832*
19. Makeeva A., Rodriguez-Montesinos J., Zelenikhin P., Nesmelov A., Preissner K.T., Cabrera-Fuentes H.A., Ilinskaya O.N. Antitumor macrophage response to Bacillus pumilus ribonuclease (binase). *Mediators Inflamm., 2017, vol. 2017: 4029641. doi: 10.1155/2017/4029641*
20. Monteleone N.J., Lutz C.S. miR-708-5p: a microRNA with emerging roles in cancer. *Oncotarget, 2017, vol. 8, no. 41, pp. 71292–71316. doi: 10.18632/oncotarget.19772*
21. Ortiz-Quintero B. Cell-free microRNAs in blood and other body fluids, as cancer biomarkers. *Cell Proliferation, 2016, vol. 49, no. 3, pp. 281–303. doi: 10.1111/cpr.12262*
22. Rivera A., Barr T., Rais M., Engelmann F., Messaoudi I. MicroRNAs regulate host immune response and pathogenesis during influenza infection in rhesus macaques. *Viral Immunol., 2016, vol. 29, no. 4, pp. 212–217. doi: 10.1089/vim.2015.0074*
23. Romano G., Veneziano D., Acunzo M., Croce C.M. Small non-coding RNA and cancer. *Carcinogenesis, 2017, vol. 38, no. 5, pp. 485–491. doi: 10.1093/carcin/bgx026*
24. Russell S.J., Peng K.W. Viruses as anticancer drugs. *Trends Pharmacol. Sci., 2007, vol. 28, no. 7, pp. 326–333. doi: 10.1016/j.tips.2007.05.005*
25. Shah Mahmud R., Mostafa A., Müller C., Kanrai P., Ulyanova V., Sokurenko Y., Dzieciolowski J., Kuznetsova I., Ilinskaya O., Pleschka S. Bacterial ribonuclease binase exerts an intra-cellular anti-viral mode of action targeting viral RNAs in influenza a virus infected MDCK-II cells. *Virol. J., 2018, vol. 15, no. 1: 5. doi: 10.1186/s12985-017-0915-1*
26. Tasian S.K., Park J.R., Martin E.T., Englund J.A. Influenza-associated morbidity in children with cancer. *Pediatr. Blood Cancer, 2008, vol. 50, no. 5, pp. 983–987. doi: 10.1002/pbc.21472*
27. Ulyanova V., Shah Mahmud R., Dudkina E., Vershinina V., Domann E., Ilinskaya O. Phylogenetic distribution of extracellular guanyl-preferring ribonucleases renews taxonomic status of two Bacillus strains. *J. Gen. Appl. Microbiol., 2016, vol. 62, no. 4, pp.181–188. doi: 10.2323/jgam.2016.02.005*
28. Vert A., Castro J., Ribó M., Benito A., Vilanova M. A nuclear-directed human pancreatic ribonuclease (PE5) targets the metabolic phenotype of cancer cells. *Oncotarget, 2016, vol. 7, no. 14, pp. 18309–18324. doi: 10.18632/oncotarget.7579*
29. Wang B., Li J.D., Sun M., Sun L.H., Zhang X.Y. MiRNA Expression in breast cancer varies with lymph node metastasis and other clinicopathologic features. *IUBMB life, 2014, vol. 66, no. 5, pp. 371–377. doi: 10.1002/iub.1273*
30. Wang R., Zhang Y.-Y., Lu J.-S., Xia B.-H., Yang Z.-X., Zh X.-D., Zhou X.-W., Huang P.-T. The highly pathogenic H5N1 influenza A virus down-regulated several cellular MicroRNAs which target viral genome. *J. Cell Mol. Medicine, 2017, vol. 21, no. 11, pp. 3076–3086. doi: 10.1111/jcmm.13219*
31. Yanagawa-Matsuda A., Mikawa Y., Habiba U., Kitamura T., Yasuda M., Towfik-Alam M., Kitagawa Y., Minowa K., Shindoh M., Higashino F. Oncolytic potential of an E4-deficient adenovirus that can recognize the stabilization of AU-rich element containing mRNA in cancer cells. *Oncol. Rep., 2019, vol. 41, no. 2, pp. 954–960. doi: 10.3892/or.2018.6865*

Авторы:

Байчурина И.А., младший научный сотрудник института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия;
Маркелова М.И., аспирант, научный сотрудник института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия;
Шах Махмуд Р., к.б.н., доцент, старший научный сотрудник института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

Authors:

Baichurina I.A., Junior Researcher, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Privolzhsky Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Kazan, Russian Federation;
Markelova M.I., PhD Student, Researcher, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Privolzhsky Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Kazan, Russian Federation;
Shah Mahmud R., PhD (Biology), Associate Professor, Senior Researcher, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Privolzhsky Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Kazan, Russian Federation.

Поступила в редакцию 10.04.2020
Отправлена на доработку 05.11.2021
Принята к печати 25.12.2021

Received 10.04.2020
Revision received 05.11.2021
Accepted 25.12.2021

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2022, vol. 12, no. 2, pp. 271–278

Инфекция и иммунитет
2022, Т. 12, № 2, с. 271–278

ЦИТОКИНОВЫЕ МАРКЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ ИНФЕКЦИОННОГО ЭНДОКАРДИТА

Е.С. Самойленко[1,2], Н.В. Колесникова[1], А.А. Подсадняя[3], А.В. Братова[2]

[1] *ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Краснодар, Россия*
[2] *ГБУЗ Научно-исследовательский институт — Краевая клиническая больница № 1 им. проф. С.В. Очаповского Министерства здравоохранения Краснодарского края, г. Краснодар, Россия*
[3] *ГБУЗ Специализированная клиническая инфекционная больница Министерства здравоохранения Краснодарского края, г. Краснодар, Россия*

Резюме. *Введение.* Инфекционный эндокардит является заболеванием бактериальной природы, при котором возбудитель локализован преимущественно на клапанах сердца и эндокарде. Такое состояние сопровождается иммунопатологическими проявлениями и возможной генерализацией септического процесса, что является прогнозом неблагоприятного исхода. В настоящее время причинами смерти пациентов с эндокардитом все чаще являются тромбоэмболические осложнения, выраженность которых зависит от варианта течения заболевания. Важное значение в нарушении баланса иммунной системы при инфекционном процессе отводят нарушениям межклеточного взаимодействия, осуществляемого посредством цитокиновой сети. Активированные иммунные клетки синтезируют цитокины, изучение которых важно с точки зрения интерпретации изменений функциональности иммунной системы, оценки степени тяжести заболеваний и контроля эффективности проводимой терапии. Несмотря на современные успехи диагностики и лечения, инфекционный эндокардит остается тяжелым заболеванием, ассоциированным с высокой смертностью. Своевременный диагностический процесс и раннее начало лечения являются главными факторами для успешного ведения пациента. Это обусловливает необходимость совершенствования диагностики различных клинических вариантов течения эндокардита с учетом патогенетически значимых цитокинов. Цель исследования — сравнительная оценка значимости сывороточных концентраций цитокинов пациентов с неосложненным течением инфекционного эндокардита, а также при развитии тромбоэмболических осложнений с определением цитокиновых маркеров вариантов течения эндокардита. *Материалы и методы.* Проведено иммунологическое обследование 119 образцов сыворотки пациентов с подтвержденным диагнозом «инфекционный эндокардит» и 20 образцов сыворотки крови относительно здоровых лиц. В зависимости от клинической формы заболевания, пациенты были разделены на 4 группы: 1 группа — первичный инфекционный эндокардит с тромбоэмболическими осложнениями (n = 24), 2 — первичный, без тромбоэмболических осложнений (n = 34), 3 — вторичный, с тромбоэмболическими осложнениями (n = 27), 4 — вторичный, без тромбоэмболических осложнений (n = 34). Контрольную группу составили 20 условно здоровых субъектов. Во всех группах было проведено иммунологическое исследование концентраций сывороточных уровней цитокинов. *Результаты.* Выявили статистически значимое увеличение сывороточных концентраций IL-10, IL-6, VEGF-A, IL-18, IL-1Ra и IL-8 во всех клинических группах пациентов от таковых в контрольной группе ($p < 0,05$). Методом корреляционного анализа обнаружили значимую положительную связь IL-10 с IL-18 и IL-6, при которой увеличение концентрации IL-10 приводит к соответствующему увеличению уровня провоспалительных IL-18 и IL-6. Маркером вторичного эндокардита явилось увеличение

Адрес для переписки:
Самойленко Екатерина Сергеевна
350063, Россия, г. Краснодар, ул. им. Митрофана Седина, 4,
Кубанский государственный медицинский университет.
Тел.: 8 (918) 969-71-42.
E-mail: kondrenko.ekaterina@yandex.ru

Contacts:
Ekaterina S. Samoylenko
350063, Russian Federation, Krasnodar, Mitrofana Sedina str., 4,
Kuban State Medical University.
Phone: +7 (918) 969-71-42.
E-mail: kondrenko.ekaterina@yandex.ru

Для цитирования:
Самойленко Е.С., Колесникова Н.В., Подсадняя А.А., Братова А.В. Цитокиновые маркеры клинических вариантов инфекционного эндокардита // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 2. С. 271–278. doi: 10.15789/2220-7619-CMO-1851

Citation:
Samoylenko E.S., Kolesnikova N.V., Podsadnyaya A.A., Bratova A.V. Cytokine markers of clinical variants of infective endocarditis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 2, pp. 271–278. doi: 10.15789/2220-7619-CMO-1851

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-CMO-1851

уровня сывороточных концентраций IFNγ. Выявлена характерная особенность первичного инфекционного эндокардита с тромбоэмболическими осложнениями — значительное возрастание содержания концентраций IL-8, IL-1Ra и IL-6 в сыворотке крови; а маркеры вторичного осложненного эндокардита — увеличение концентрации IL-6, VEGF-A и IL-18.

Ключевые слова: *инфекционный эндокардит, цитокины, интерлейкины, патогенез, диагностика, тромбоэмболические осложнения.*

CYTOKINE MARKERS OF CLINICAL VARIANTS OF INFECTIVE ENDOCARDITIS

Samoylenko E.S.[a,b], Kolesnikova N.V.[a], Podsadnyaya A.A.[c], Bratova A.V.[b]

[a] *Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation*
[b] *Scientific Research Institute — Ochapovsky Regional Clinical Hospital No. 1, Krasnodar, Russian Federation*
[c] *Specialized Clinical Infectious Diseases Hospital, Krasnodar, Russian Federation*

Abstract. *Introduction.* Infective endocarditis is a bacterial disease. Pathogen is localized mainly on heart valves and endocardium. This condition is accompanied by immunopathological manifestations and potential generation of septic process being unfavorable prognosis for disease outcome. Currently, the causes of death of patients with endocarditis have been increasingly presented as thromboembolic complications, which severity depends on variant of the disease course. An important role in imbalanced immune system in the infectious process is assigned to altered intercellular interaction mediated via cytokine network. Activated immune cells produce cytokines, which investigating is important in terms of interpreting changes in immune system functionality, assessing the severity of diseases and controlling therapeutic effectiveness. Infective endocarditis remains a severe disease associated with high mortality despite current advances in diagnostics and treatment. A timely diagnostic process and early initiation of treatment are major factors for successful patient management necessitating to improve diagnostics of various clinical variants of endocarditis course, taking into account pathogenetically relevant cytokines. Objective was to comparatively evaluate the importance of serum cytokine concentrations in patients with uncomplicated course of infective endocarditis and its thromboembolic complications and determine cytokine markers of various variants of endocarditis course. *Materials and methods.* An immunological examination of 119 blood serum samples from patients with confirmed diagnosis of infectious endocarditis and 20 samples from apparently healthy persons was carried out. Depending on the clinical disease form, the patients were divided into 4 groups: group 1 — primary infective endocarditis (PIE) with thromboembolic complications (n = 24), 2 — PIE without thromboembolic complications (n = 34), 3 — secondary IE with thromboembolic complications (n = 27), 4 — secondary IE without thromboembolic complications (n = 34). The control group consisted of 20 apparently healthy subjects. Immunological studies of serum cytokine concentrations were conducted in all groups. *Results.* Statistically significant increase in serum concentration of IL-10, IL-6, VEGF-A, IL-18, IL-1Ra and IL-8 was revealed in all clinical groups of patients compared to those in control group ($p < 0,05$). By correlation analysis, we found a significant positive relationship between IL-10 and IL-18 or IL-6. An increase in the concentration of IL-10 leads to increased level of pro-inflammatory IL-18 and IL-6. The marker of secondary endocarditis was observed as increased level of serum concentrations of IFNγ. A characteristic feature of primary infective endocarditis with thromboembolic complications was revealed as significantly increased serum concentration of IL-8, IL-1Ra and IL-6. Markers of secondary complicated endocarditis were identified as increased level of IL-6, VEGF-A and IL-18.

Key words: *infective endocarditis, cytokines, interleukins, pathogenesis, diagnosis, thromboembolic complications.*

Введение

Инфекционный эндокардит (ИЭ) — заболевание бактериальной природы с преимущественной локализацией возбудителей на поверхности эндокарда, клапанах сердца, эндотелия начальных отделов крупных сосудов, характеризующееся быстрым развитием клапанной недостаточности и системными эмболическими осложнениями. Частота эндокардита в общей популяции колеблется в диапазоне 1,5–11,6 случаев на 100 тыс. населения [14, 18, 21]. Внутригоспитальная летальность при этом составляет 6,9–20%, а годичная смертность достигает 40% [7, 12, 15]. Причинами смерти пациентов с инфекционным эндокардитом часто являются тромбоэмболические осложнения (ТЭО). Это инфаркты, инсульты, тромбоэмболии артерий и другие состояния, выраженность которых зависит от клинического варианта ИЭ [1, 12].

Современные теоретические знания и опыт клиницистов указывают на то, что скорость, с которой инфекционный процесс будет распространяться, зависит и от бактериального агента, и от состояния организма индивидуума — от комплекса реакций их взаимодействия, а особенности формирования и течения инфекционного процесса определены, с одной стороны, чужеродностью самого возбудителя, а с другой — состоянием иммунной системы (ИС) человека [4]. ИЭ часто сопровождается генерализацией септического процесса и иммунопатологическими проявлениями. Важную роль в нарушении баланса ИС при инфекционном за-

болевании отводят нарушениям межклеточного взаимодействия, реализуемого посредством цитокин-рецепторной сети [5]. Активированные клетки иммунной системы выделяют цитокины, изучение которых важно с точки зрения интерпретации нарушений функциональной жизнеспособности иммунной системы организма, оценки степени тяжести, контроля эффективности проводимой терапии, прогнозирования течения и исхода заболеваний. Цитокины участвуют в различных воспалительных процессах, провоцируя изменения в гемодинамике, нарушения микроциркуляции, образование отеков, развитие гипоксии и нарушение метаболизма тканей, а баланс про- и противовоспалительных цитокинов при воспалении во многом определяет направленность, тяжесть и исход заболеваний [4, 16]. В условиях постоянной бактериемии происходит непрерывная стимуляция иммунитета с увеличением концентрации в крови цитокинов, играющих важную роль в координации и поддержании воспаления на всех его стадиях, что обосновывает целесообразность исследования их для выявления основ патогенеза различных заболеваний [3].

Целью настоящего исследования была сравнительная оценка значимости некоторых цитокинов периферической крови пациентов с неосложненным течением ИЭ, а также при его ТЭО с определением цитокиновых маркеров вариантов течения ИЭ.

Материалы и методы

Проведено иммунологическое обследование 119 пациентов, поступивших в ГБУЗ «НИИ–ККБ № 1» г. Краснодара по поводу ИЭ. В зависимости от клинико-морфологической формы и отсутствия/наличия ТЭО, все пациенты были разделены на 4 группы: 1 группа — первичный ИЭ с ТЭО (n = 24), 2 — первичный ИЭ без ТЭО (n = 34), 3 — вторичный ИЭ с ТЭО (n = 27), 4 — вторичный ИЭ без ТЭО (n = 34). В группу контроля вошли 20 условно здоровых субъектов. Работа выполнена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности, получено разрешение Независимого этического комитета ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России. Все участники были ознакомлены с целью и содержанием исследования и дали письменное информированное согласие. Все группы обследуемых были сопоставимы по возрасту (медиана возраста пациентов — 52±11 лет, группы контроля — 53±10 лет), по клапанной локализации возбудителя, по сопутствующей патологии и этиологическому инфекционному фактору. Критериями исключения из исследования являлись хронические инфекционно-воспалительные состояния, аутоиммунные заболевания, сопутствующая острая патология, аллергические заболевания в стадии обострения, беременность, отсутствие письменного информированного согласия, возраст < 18 лет или > 70 лет.

Лабораторное исследование цитокинов венозной крови было проведено во всех группах, в том числе у пациентов основной клинической группы. Цитокины периферической крови определяли в первый день их поступления в стационар. Сывороточную концентрацию интерлейкина-8 (IL-8), интерлейкина-17A (IL-17A), фактора некроза опухоли-альфа (TNFα), интерлейкина-4 (IL-4), интерферона-гамма (IFNγ), антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra), интерлейкина-1β (IL-1β), интерлейкина-18 (IL-18), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-A), интерлейкина-6 (IL-6) и интерлейкина-10 (IL-10) оценивали методом иммуноферментного анализа с использованием следующего оборудования: Thermo Scientific Multiscan FC (Финляндия), ELMI Shaker-Thermostat ST-3L (Латвия), Tecan HydroFlex (Австрия), а также наборов соответствующих моноклональных антител к IL-10, IL-18, VEGF, IL-1β (ООО «Вектор-Бест», Россия) и к IL-8, IL-17A, TNFα, IL-4, IFNγ, IL-1Ra, IL-6 (ООО «Цитокин», Россия).

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы IBM SPSS Statistics, версия 26. Проверка на нормальность распределения признаков осуществлялась посредством критерия Шапиро–Уилка. Описательная статистика представлена в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (C_{25} и C_{75}) — Me (C_{25}–C_{75}). Независимые группы сравнивали попарно с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни (U). Корреляционную связь между цитокинами оценивали с помощью теста ранговой корреляции Спирмена. Критическое значение вероятности (p) < 0,05 являлось пороговым уровнем статистической значимости.

Результаты

Исследование уровней сывороточных цитокинов проводилось в первый день поступления пациентов, после верификации диагноза (инфекционный эндокардит) в соответствии с разработанными для ИЭ диагностическими критериями Duke [13]. Целесообразность исследования концентрации цитокинов до начала лечения пациентов с различными клиническими вариантами течения ИЭ обусловлена их дальнейшей продолжительной антибиотикотерапией (табл. 1).

Анализ полученных данных позволил выявить статистически значимое увеличение сывороточной концентрации IL-10, IL-6, VEGF-A, IL-18, IL-1Ra и IL-8 во всех группах пациентов

с ИЭ от таковой в контрольной группе ($p < 0,05$), тогда как уровень содержания IFNγ достоверно превышал контрольные значения лишь у пациентов со вторичным ИЭ, причем наиболее выраженно — при отсутствии ТЭО. Сравнительная оценка межгрупповых различий в основной клинической группе выявила статистически значимое увеличение уровня содержания IL-1β и VEGF-A в 3 группе и содержания IFNγ в 4 группе по сравнению с таковыми у пациентов 1 группы. Также при анализе 1 группы обнаружены значимое увеличение концентраций IL-8, IL-1Ra и IL-6 относительно 2 группы; IL-1Ra — относительно 3 группы и IL-6 — относительно четвертой. Кроме того, было выявлено увеличение концентрации IL-1β, VEGF-A и IL-6 у пациентов 3 группы (вторичный ИЭ с ТЭО) относительно таковой при первичном ИЭ без ТЭО (2 группа); увеличения концентрации VEGF-A — при первичном неосложненном ИЭ (2 группа) относительно вторичного неосложненного ИЭ (4 группа). В то же время наличие ТЭО у пациентов

Таблица 1. Исходный цитокиновый профиль периферической крови пациентов с различными клиническими вариантами ИЭ [Me (C_{25}–C_{75})]

Table 1. Baseline cytokine profile of peripheral blood of patients with different clinical IE variants [Me (C_{25}–C_{75})]

Группы/ цитокины Groups/ cytokines	Основная клиническая группа (ИЭ, n = 119) Main clinical group (IE, n = 119)				Группа контроля Control group n = 20
	1 группа 1 group	2 группа 2 group	3 группа 3 group	4 группа 4 group	
	Первичный ИЭ с ТЭО Primary IE with TEC n = 24	Первичный ИЭ без ТЭО Primary IE without TEC n = 34	Вторичный ИЭ с ТЭО Secondary IE with TEC n = 27	Вторичный ИЭ без ТЭО Secondary IE without TEC n = 34	
IL-8, pg/mL	190,49 (121,52–292,1)	87,87 (46,54–284,57)	157,30 (86,16–256,52)	227,0 (87,44–262,30)	42,37 (5,62–54,88)
	$p_0 < 0,01$ $p_1 = 0,039$	$p_0 < 0,01$	$p_0 < 0,01$	$p_0 < 0,01$	
IL-17A, pg/mL	0,00 (0,00–3,22)	0,00 (0,00–1,17)	0,00 (0,00–1,18)	0,00 (0,00–1,17)	0,00 (0,00–0,00)
TNFα, pg/mL	0,00 (0,00–0,21)	0,00 (0,00–0,36)	0,07 (0,00–0,15)	0,00 (0,00–0,72)	0,00 (0,00–0,13)
IL-4, pg/mL	6,40 (5,24–19,66)	7,15 (3,62–15,31)	8,18 (3,81–9,37)	7,80 (4,70–15,32)	5,56 (2,53–12,66)
IFNγ, pg/mL	7,96 (0,90–38,24)	19,06 (3,89–40,32)	15,33 (8,69–21,20)	24,88 (16,76–39,13)	7,55 (0,00–12,40)
			$p_0 = 0,014$ $p_5 = 0,001$	$p_0 < 0,01$ $p_3 = 0,032$	
IL-1Ra, pg/mL	2002,10 (1170,35–4462,14)	915,22 (394,77–4189,44)	1129,45 (829,03–1841,32)	2173,55 (721,55–4752,10)	326,15 (300,13–420,07)
	$p_0 < 0,01$ $p_1 = 0,048$	$p_0 < 0,01$	$p_0 < 0,01$ $p_2 = 0,027$	$p_0 < 0,01$	
IL-1β, pg/mL	1,55 (0,83–2,57)	1,99 (1,42–3,21)	3,13 (2,40–5,11)	1,81 (1,56–4,45)	2,05 (1,77–2,44)
	$p_2 = 0,001$	$p_4 = 0,004$	$p_0 < 0,01$	$p_3 = 0,022$	
IL-18, pg/mL	596,90 (314,59–865,06)	655,49 (429,10–1026,34)	759,33 (445,75–988,08)	357,65 (261,00–751,85)	293,91 (234,10–341,93)
	$p_0 = 0,001$	$p_0 = 0,001$	$p_0 < 0,01$ $p_6 = 0,035$	$p_0 = 0,049$	
VEGF-A, pg/mL	558,40 (268,74–1032,06)	648,60 (249,94–985,39)	1010,08 (333,40–1226,66)	226,00 (112,04–612,50)	166,05 (68,68–203,55)
	$p_0 < 0,01$ $p_2 = 0,018$	$p_0 < 0,01$ $p_4 = 0,039$ $p_5 = 0,002$	$p_0 < 0,01$ $p_6 < 0,01$	$p_0 = 0,014$ $p_3 = 0,014$	
IL-6, pg/mL	10,58 (6,86–32,91)	3,35 (2,03–20,04)	14,97 (7,77–33,60)	6,42 (1,50–12,32)	0,00 (0,00–1,35)
	$p_0 < 0,01$ $p_1 = 0,048$	$p_0 < 0,01$ $p_4 = 0,006$	$p_0 < 0,01$ $p_6 = 0,001$	$p_0 < 0,01$ $p_3 = 0,013$	
IL-10, pg/mL	12,56 (8,28–15,37	12,60 (7,37–19,50)	12,47 (11,01–20,8)	11,08 (8,50–23,63)	4,53 (3,77–5,11)
	$p_0 < 0,01$	$p_0 < 0,01$	$p_0 < 0,01$	$p_0 < 0,01$	

Примечание. В таблице представлены только статистически значимые различия между группами ($p < 0,05$); p_0 — статистически значимые различия с контрольными значениями; p_1 — статистически значимые различия между 1 и 2 группами; p_2 — между 1 и 3 группами; p_3 — между 1 и 4 группами; p_4 — между 2 и 3 группами; p_5 — между 2 и 4 группами; p_6 — между 3 и 4 группами.

Note. Only statistically significant differences between groups ($p < 0.05$) are shown; p_0 — a significant difference from the control values; p_1 — significant differences between groups 1 and 2; p_2 — between groups 1 and 3; p_3 — between groups 1 and 4; p_4 — between 2 and 3 groups; p_5 — between 2 and 4 groups; p_6 — between 3 and 4 groups.

со вторичным ИЭ сопровождается статистически значимым увеличением IL-18, VEGF-A и IL-6, а также снижением IFNγ относительно аналогичных показателей в 4 группе.

При анализе диаграмм (рис. 1–4) («ящиков с усами», наглядно демонстрирующих различия между медианами различных групп и расположение квартилей 25 и 75), обращают на себя внимание значения IL-6, VEGF-A и IL-18, которые при ИЭ отличаются не только от контрольных, но и имеют отчетливые межгрупповые различия. В частности, распределение медиан фактора роста эндотелия сосудов (рис. 2) показало статистически значимую разницу между всеми группами сравнения ($p < 0,05$).

Для оценки корреляционной связи между различным цитокинами был проведен тест ранговой корреляции Спирмена (табл. 2).

Несмотря на то, что по уровню значимости ($p < 0,01$) корреляция обнаружена для многих пар тестов, это вовсе не указывает на ее выраженность: наиболее сильная связь выявлена для пары «IL-18–IL-10» (коэффициент корреляции 0,657), а более умеренная — для пары «IL-6–IL-10» (коэффициент корреляции 0,571). В обоих случаях связь положительная, то есть с ростом одного показателя увеличивается значение другого. Наглядно эта связь прослеживается на диаграммах рассеяния с линией регрессии (рис. 5, 6).

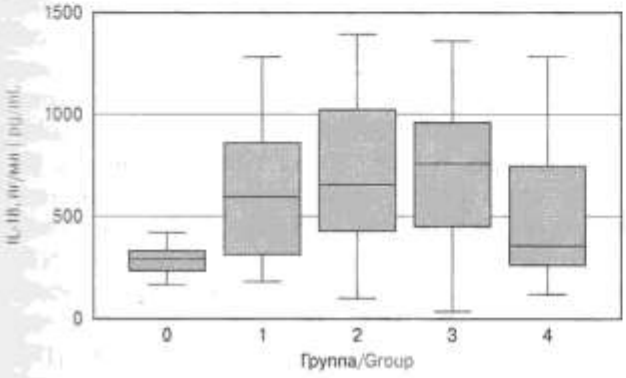

Рисунок 1. Распределение концентрации IL-18

Figure 1. Distribution of IL-18 concentration

Примечание. 0 — группа контроля, 1 — первичный ИЭ с ТЭО, 2 — первичный ИЭ без ТЭО, 3 — вторичный ИЭ с ТЭО, 4 — вторичный ИЭ без ТЭО.

Note. 0 — control group, 1 — primary IE with TEC, 2 — primary IE with TEC, 3 — secondary IE with TEC, 4 — secondary IE without TEC.

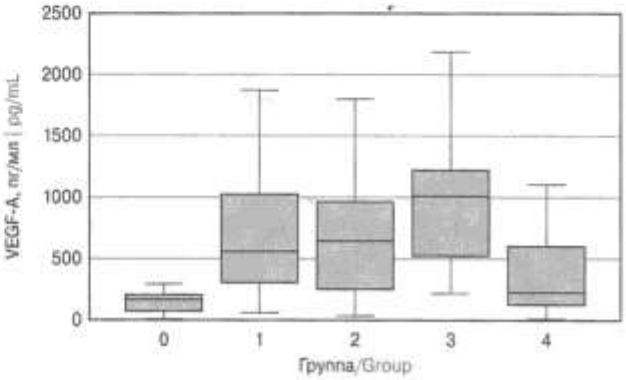

Рисунок 2. Распределение концентрации VEGF-A

Figure 2. Distribution of VEGF-A concentration

Примечание. 0 — группа контроля, 1 — первичный ИЭ с ТЭО, 2 — первичный ИЭ без ТЭО, 3 — вторичный ИЭ с ТЭО, 4 — вторичный ИЭ без ТЭО.

Note. 0 — control group, 1 — primary IE with TEC, 2 — primary IE with TEC, 3 — secondary IE with TEC, 4 — secondary IE without TEC.

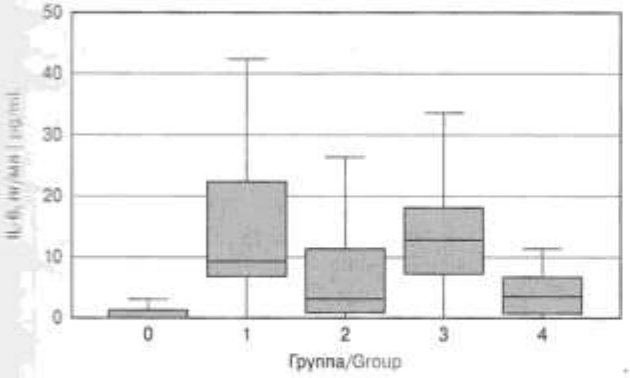

Рисунок 3. Распределение концентрации IL-6

Figure 3. Distribution of IL-6 concentration

Примечание. 0 — группа контроля, 1 — первичный ИЭ с ТЭО, 2 — первичный ИЭ без ТЭО, 3 — вторичный ИЭ с ТЭО, 4 — вторичный ИЭ без ТЭО.

Note. 0 — control group, 1 — primary IE with TEC, 2 — primary IE with TEC, 3 — secondary IE with TEC, 4 — secondary IE without TEC.

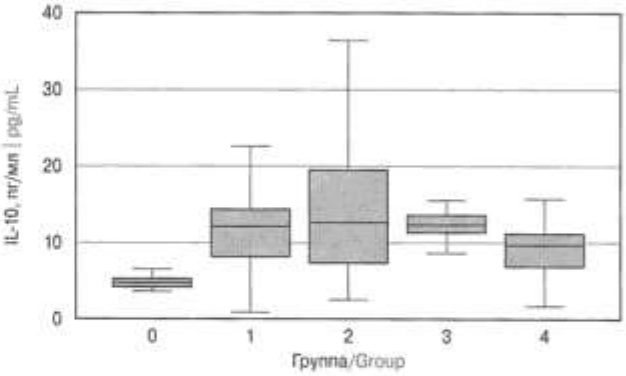

Рисунок 4. Распределение концентрации IL-10

Figure 4. Distribution of IL-10 concentration

Примечание. 0 — группа контроля, 1 — первичный ИЭ с ТЭО, 2 — первичный ИЭ без ТЭО, 3 — вторичный ИЭ с ТЭО, 4 — вторичный ИЭ без ТЭО.

Note. 0 — control group, 1 — primary IE with TEC, 2 — primary IE with TEC, 3 — secondary IE with TEC, 4 — secondary IE without TEC.

Таблица 2. Тест ранговой корреляции Спирмена
Table 2. Spearman rank correlation test

Цитокины Cytokines		IL-8	IL-10	IL-18	VEGF-A	IL-6	IL-1Ra
IL-8	r_s	—	0,544*	0,297*	0,049	0,426*	0,404*
IL-10	r_s	0,544*	—	0,657*	0,244*	0,571*	0,346*
IL-18	r_s	0,297*	0,657*	—	0,262*	0,498*	0,134
VEGF-A	r_s	0,049	0,244*	0,262*	—	0,547*	0,065
IL-6	r_s	0,426*	0,571*	0,498*	0,547*	—	0,356*
IL-1Ra	r_s	0,404*	0,346*	0,134	0,065	0,356*	—

Примечания: r_s — коэффициент корреляции Спирмена; * — корреляция значима на уровне $p < 0,01$.
Note: r_s — Spearman correlation coefficient; * — correlation is significant at $p < 0.01$.

Обсуждение

Среди исследуемых сывороточных цитокинов у пациентов с различными клиническими вариантами ИЭ привлекает внимание VEGF-A, показавший значительные отличия от показателей контрольной группы, а также статистически значимые межгрупповые различия. Уровни его концентрации варьировали от 166,05 (68,68–203,55) пг/мл в контрольной группе до 1010,08 (333,40–1226,66) пг/мл — при вторичном ИЭ с ТЭО, что было статистически значимо выше показателей у пациентов 1, 2 и 4 группы. Потребность дополнительной выработки VEGF-A клетками организма необходима для усиления ангиогенеза [9] и, как следствие, питания уже и без того поврежденных тканей не только эндокарда, но и других систем, затронутых ТЭО [19]. С другой стороны, именно в эндотелиальных клетках, контролирующих гомеостаз и сосудисто-тканевую проницаемость, развертываются типичные патогистологические изменения — деструктивные и некробиотические, приводящие к плазморее, гиповолемии и прогрессирующему расстройству гемодинамики [6, 10].

Согласно результатам проведенного исследования медиана, IL-8 (провоспалительного хемокина CXCL8) была статистически выше физиологической у пациентов с ИЭ, однако наибольшее увеличение его концентрации наблюдалось при вторичном ИЭ — до 5 раз. Наряду с моноцитами/макрофагами и эпителиоцитами, продуцентами IL-8 являются эндотелиальные клетки, активируемые как прямыми контактами с патогенами, так и с провоспалительными цитокинами — IL-1, TNFα, IL-6, IL-17A и др. [8]. Известная способность отдельных цитокинов контролировать синтез других подтверждается, в частности, эффектами моноцитарных TNFα и IL-1β, способных индуцировать синтез моноцитами IL-10, который, в свою очередь, угнетает выработку провоспалительных цитокинов [17].

Между тем проведенное нами исследование сывороточной концентрации TNFα у пациентов с ИЭ различных клинических форм не выявило значимых межгрупповых различий и отличий от контроля, что может быть обусловлено существенным повышением уровня противовоспалительного IL-10 (в среднем в 3 раза) у пациентов с различными вариантами течения ИЭ. Что также касается провоспалительного IL-1β, его уровень оказался выше контрольного лишь в группе пациентов со вторичным ИЭ с ТЭО, тогда как в других клинических подгруппах при общей тенденции к снижению уровня IL-1β относительно возрастной нормы, имели место некоторые межгрупповые различия.

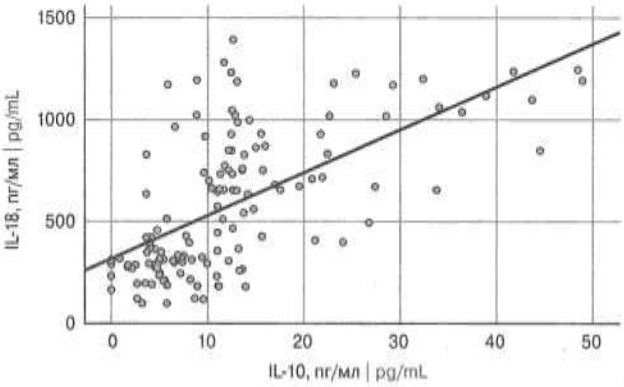

Рисунок 5. Диаграмма рассеяния IL-18–IL-10
Figure 5. Scattering diagram IL-18–IL-10

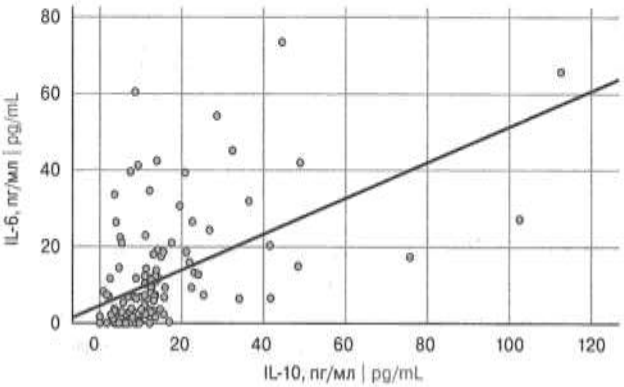

Рисунок 6. Диаграмма рассеяния IL-6–IL-10
Figure 6. Scattering diagram IL-6–IL-10

Кроме того, проведенный корреляционный анализ позволил обнаружить положительную корреляцию IL-10 с IL-6 и IL-18, выражающуюся в том, что увеличение концентрации IL-10 приводит к соответствующему увеличению уровня содержания в сыворотке провоспалительных IL-6 и IL-18. При этом важно отметить, что эффекты IL-10 могут быть существенно усилены за счет другого противовоспалительного цитокина — IL-1Ra, уровень которого был более высоким у пациентов как с первичным (в 6,1 раза), так и со вторичным (в 6,6 раз) ИЭ.

Сывороточная концентрация таких провоспалительных цитокинов, как IFNγ, IL-6 у пациентов с ИЭ наиболее выраженно отличалась от таковой у практически здоровых лиц и имела существенные межгрупповые различия. При этом наиболее высокий уровень содержания IL-6 отмечен в группе пациентов с осложненным вариантом течения ИЭ (1 и 3 группы), а IFNγ — у пациентов с ИЭ без тромбоэмболических осложнений. Тем не менее, адекватный иммунный ответ, обеспечивающий благоприятное течение ИЭ, сопровождается повышением уровней как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов, которые благодаря своему взаимодействию способны изменять базальные уровни концентраций в разные периоды воспаления, но при осложненном течении ИЭ наблюдается усиление стимуляции и секреции цитокинов [2].

Заключение

Несмотря на использование новейших диагностических технологий, даже в странах с высокоразвитой экономикой, в 38,2% случаев ИЭ обнаруживается только на этапе аутопсии [11, 20]. Высокий уровень осложнений при ИЭ во многом обусловлен недостаточностью ранней диагностики заболевания, изменениями возрастного состава контингента пациентов, растущей устойчивостью возбудителей к антибиотикам [22]. Это обусловливает необходимость совершенствования диагностики различных клинических вариантов течения ИЭ с учетом патогенетически значимых цитокинов. Индивидуальная оценка риска, основанная не только на клинических характеристиках, но и на цитокиновых маркерах, является примером нового подхода к диагностике и ведению больных с ИЭ, позволяющего оптимизировать своевременный прогноз неблагоприятных вариантов его течения. Анализ полученных в исследовании результатов позволяет заключить, что статистически значимое увеличение сывороточной концентрации IL-8, IL-18, IL-1Ra, VEGF-A, IL-6 и IL-10 подтверждает диагноз «инфекционный эндокардит», маркерами вторичного ИЭ является увеличение уровня содержания IFNγ. Наряду с этим характерной особенностью осложненного (ТЭО) течения первичного ИЭ можно считать значительное возрастание сывороточной концентрации IL-8, IL-1Ra и IL-6 не только относительно контроля, но и в сравнении с группой пациентов с первичным неосложненным течением (2 группа), а маркерами вторичного осложненного ИЭ — увеличение концентрации IL-6, VEGF-A и IL-18. Таким образом, оценку сывороточной концентрации IL-8, IL-18, VEGF-A, IL-6, IL-10, IL-1Ra и IFNγ можно считать целесообразной при лабораторном обследовании пациентов с ИЭ и использовать эти показатели для дифференциальной диагностики клинических вариантов его течения.

Список литературы/References

1. Виноградова Т.Л. Инфекционный эндокардит: современное течение // Клиницист. 2011. Т. 5, № 3. С. 4–9. [Vinogradova T.L. Infective endocarditis: modern course. *Klinitsist = The Clinician, 2011, vol. 5, no. 3, pp. 4–9. (In Russ.)*] *doi: 10.17650/1818-8338-2011-3-4-9*
2. Железникова Г.Ф. Цитокины как предикторы течения и исхода инфекций // Цитокины и воспаление. 2009. Т. 8, № 1. С. 10–17. [Zheleznikova G.F. Cytokines as predictors of infection course and outcome. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation, 2009, vol. 8, no. 1, pp. 10–17. (In Russ.)*]
3. Лутфарахманов И.И., Миронов П.И., Тихонов А.С. Взаимосвязь полиморфизма гена фактора некроза опухоли альфа с развитием гнойно-септических осложнений тяжелого острого панкреатита // Медицинский вестник Северного Кавказа. 2017. Т. 12, № 2. С. 145–148. [Lutfarakhmanov I.I., Mironov P.I., Tikhonov A.S. Relationship between tumor necrosis factor alpha gene polymorphism and development of purulent septic complications of severe acute pancreatitis. *Medicinskij vestnik Severnogo Kavkaza = Medical News of North Caucasus, 2017, vol. 12, no. 2, pp. 145–148. (In Russ.)*] *doi: 10.14300/mnnc.2017.12041*
4. Орадова А.Ш., Канжигалина З.К., Касенова Р.К. Лабораторная диагностика цитокинов (обзорная статья) // Вестник КазНМУ. 2015. № 1. С. 357–360. [Oradova A.S., Kangigalina Z.K., Kasenova R.K. Laboratory diagnosis of cytokines. *Vestnik KazNMU = Bulletin of the Kazakh National Medical University, 2015, no. 1, pp. 357–360. (In Russ.)*]
5. Araújo I.R., Ferrari T.C., Teixeira-Carvalho A., Campi-Azevedo A.C., Rodrigues L.V., Guimarães Júnior M.H., Barros T.L., Gelape C.L., Sousa G.R., Nunes M.C. Cytokine signature in infective endocarditis. *PLoS One, 2015, vol. 10, no. 7: e0133631. doi: 10.1371/journal.pone.0133631*
6. Carmeliet P., Jain R.K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature, 2011, vol. 473, no. 7347, pp. 298–307. doi: 10.1038/nature10144*
7. Cresti A., Chiavarelli M., Scalese M., Nencioni C., Valentini S., Guerrini F., D'Aiello I., Picchi A., De Sensi F., Habib G. Epidemiological and mortality trends in infective endocarditis, a 17-year population-based prospective study. *Cardiovasc. Diagn. and Ther., 2017, vol. 7, no. 1, pp. 27–35. doi: 10.21037/cdt.2016.08.09*

8. Ekdahl C., Broqvist M., Franzen S., Ljunghusen O., Mailer R., Sander B. IL-8 and tumor necrosis factor alpha in heart valves from patients with infective endocarditis. *Scand. J. Infect. Dis., 2002, vol. 34, no. 10, pp. 759–762. doi: 10.1080/00365540210147912*
9. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2009, vol. 29, no. 6, pp. 789–791. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.179663*
10. Ferrara N. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth. *Eur. Cytokine Netw., 2009, vol. 20, no. 4, pp. 158–163. doi: 10.1684/ecn.2009.0170*
11. Guerrero M.L.F., Alvarez B., Manzarbeitia F., Manzarbeitia F., Renedo G. Infective endocarditis at autopsy: a review of pathologic manifestations and clinical correlates. *Medicine (Baltimore), 2012, vol. 91, no. 3, pp. 152–164. doi: 101097/MD.0b013e3182563Iea*
12. Habib G., Erba P.A., Iung B., Donal E., Cosyns B., Laroche C., Popescu B.A., Prendergast B., Tornos P., Sadeghpour A., Oliver A., Vaskelyte J.J., Sow R., Axler O., Maggioni A.P., Lancellotti P. Clinical presentation, aetiology and outcome of infective endocarditis. Results of the ESC-EORP EURO-ENDO (European infective endocarditis) registry: a prospective cohort study. *Eur. Heart J., 2019, vol. 40, no. 39, pp. 3222–3232. doi: 10.1093/ eurheartj/ehz620*
13. Habib G., Lancellotti P., Antunes M.J., Bongiorni M.G., Casalta J.P., Del Zotti F., Dulgheru R., El Khoury G., Erba P.A., Iung B., Miro J.M., Mulder B.J., Plonska-Gosciniak E., Price S., Roos-Hesselink J., Snygg-Martin U., Thuny F., Mas P.T., Vilacosta I., Zamorano J.L. 2015 ESC guidelines for the management of infective endocarditis: the task force for the management of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by: European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Association of Nuclear Medicine (EANM). *Eur. Heart J., 2015, vol. 36, no. 44, pp. 3075–3128. doi: 10.1093/eu-rheartj/ehv319*
14. Hubers S.A., DeSimone D.C., Gersh B.J., Anavekar N.S. Infective endocarditis: a contemporary review. *Mayo Clin. Proc., 2020, vol. 95, no. 5, pp. 982–997. doi: 101016/j.mayocp.2019.12.008*
15. Marques A., Cruz I., Caldeira D., Alegria S., Gomes A., Broa A., João I., Pereira H. Risk factors for inhospital mortality in infective endocarditis. *Arq. Bras. Cardiol., 2020, vol. 114, no. 1, pp. 1–8. doi: 10.36660/abc.20180194*
16. Martínez R., Menéndez R., Reyes S., Polverino E., Cillóniz C., Martínez A., Esquinas C., Filella X., Ramírez P., Torres A. Factors associated with inflammatory cytokine patterns in community-acquired pneumonia. *Eur. Resp. J., 2011, vol. 37, no. 2, pp. 393–399. doi: 10.1183/09031936.00040710*
17. Nunes M.C.P., Araujo I.R., Carvalho A.T., Andrade L.A., Resende M.H.L., Silva J.L.P., Ferrari T.C.A. Do cytokines play a role in predicting some features and outcome in infective endocarditis? *Adv. Infect. Dis., 2013, vol. 3, pp. 115–119. doi: 10.4236/aid.2013.32018*
18. Rajani R., Klein J.L. Infective endocarditis: a contemporary update. *Clin. Med. (Lond.), 2020, vol. 20, no. 1, pp. 31–35. doi: 10.7861/clinmed.cme.20.1.1.*
19. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *J. Biochem., 2013, vol. 153, no. 1, pp. 13–19. doi: 10.1093/jb/mvs136*
20. Sun B.J., Choi S.W., Park K.H., Jang J.Y., Kim D.H., Song J.M., Kang D.H., Kim Y.S., Song J.K. Infective endocarditis involving apparently structurally normal valves in patients without previously recognized predisposing heart disease. *J. Am. Coll. Cardiol., 2015, vol. 65, no. 3, pp. 307–309. doi: 10.1016/j.jacc.201410.046*
21. Toyoda N., Chikwe J., Itagaki S., Gelijns A.C., Adams D.H., Egorova N.N. Trends in infective endocarditis in California and New York State, 1998–2013. *JAMA, 2017, vol. 317, no. 16, pp. 1652–1660. doi: 101001/jama.2017.4287*
22. Yang E., Frazee B.W. Infective Endocarditis. *Emerg. Med. Clin. N. Am., 2018, vol. 36, no. 4, pp. 645–663. doi: 10.1016/j.emc.2018.06.002*

Авторы:

Самойленко Е.С., аспирант кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет МР РФ, г. Краснодар, Россия; врач клинической лабораторной диагностики ГБУЗ Научно-исследовательский институт — Краевая клиническая больница № 1 им. проф. С.В. Очаповского МЗ Краснодарского края, г. Краснодар, Россия;
Колесникова Н.В., д.б.н., профессор, профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет МР РФ, г. Краснодар, Россия;
Подсадняя А.А., врач-инфекционист ГБУЗ Специализированная клиническая инфекционная больница МЗ Краснодарского края, г. Краснодар, Россия;
Братова А.В., зав. клинико-диагностической лабораторией ГБУЗ Научно-исследовательский институт — Краевая клиническая больница № 1 им. проф. С.В. Очаповского МЗ Краснодарского края, г. Краснодар, Россия.

Authors:

Samoylenko E.S., PhD student, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics of FPS and PPS, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation; Pathologist, Scientific Research Institute — Ochapovsky Regional Clinical Hospital No. 1, Krasnodar, Russian Federation;
Kolesnikova N.V., PhD, MD (Biology), Professor, Professor of the Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics of FPS and PPS, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation;
Podsadnyaya A.A., Infectiologist, Specialized Clinical Infectious Diseases Hospital, Krasnodar, Russian Federation;
Bratova A.V., Head of Clinical Diagnostic Laboratory, Scientific Research Institute — Ochapovsky Regional Clinical Hospital No. 1, Krasnodar, Russian Federation.

Поступила в редакцию 22.12.2021
Отправлена на доработку 14.01.2022
Принята к печати 22.01.2022

Received 22.12.2021
Revision received 14.01.2022
Accepted 22.01.2022

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2022, vol. 12, no. 2, pp. 279–287

Инфекция и иммунитет
2022, Т. 12, № 2, с. 279–287

АУТОАНТИТЕЛА К ИНТЕРФЕРОНУ АЛЬФА И ИХ ЗНАЧЕНИЕ ПРИ COVID-19

С.С. Петриков, Н.В. Боровкова, К.А. Попугаев, М.В. Сторожева, А.М. Квасников, М.А. Годков

ГБУЗ НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

Резюме. Лечение пациентов с новой коронавирусной инфекцией COVID-19 является актуальной проблемой здравоохранения последних двух лет. Известно, что белки-интерфероны играют значимую роль в противовирусном иммунитете. Некоторые патологические состояния организма сопровождаются синтезом нейтрализующих аутологичных иммуноглобулинов против собственных интерферонов (ауто-IFN-AT). Есть данные, что аутоантитела к интерферонам альфа и омега выявляются у больных с угрожающим жизни течением пневмонии, вызванной COVID-19. Целью нашего исследования было провести анализ наличия аутоантител к интерферону альфа у пациентов с коронавирусной инфекцией COVID-19 и оценить их влияние на клиническое течение заболевания. Нами было обследовано 70 пациентов с тяжелой формой COVID-19, находившихся на стационарном лечении в отделениях реанимации НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского в период с января по апрель 2021 года. Аутоантитела к интерферону альфа в сыворотке крови определяли на 8–50 сутки заболевания с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Пациенты были разделены на 2 группы: с аутоантителами к интерферону альфа (1 группа) и без аутоантител (2 группа). Оценку влияния ауто-IFN-AT проводили на основании сравнения тяжести заболевания по шкале NEWS2, длительности пребывания в отделении интенсивной терапии, длительности аппаратной респираторной поддержки, лабораторных показателей. В качестве контроля использовали результаты исследования 57 доноров антиковидной плазмы. Среди 70 обследованных пациентов аутоантитела к интерферону альфа выявили у 13 (18%) человек, концентрация варьировала от 26,8 до 1000 нг/мл. Среди доноров ауто-IFN-AT были выявлены у 5 (8,8%) человек в следовых концентрациях (от 1,65 до 12,0 нг/мл). У пациентов с ауто-IFN-AT значимо чаще развивалась дыхательная недостаточность. При анализе лабораторных показателей отмечено, что концентрация С-реактивного белка была достоверно выше в группе пациентов с ауто-IFN-AT. Смертность у пациентов с высоким уровнем аутоантител составила 60%. Таким образом, при наличии аутоантител против IFN альфа пациентам с поражением легких вследствие COVID-19 достоверно чаще требуется проведение аппаратной респираторной поддержки, при этом ее продолжительность сопоставима с таковой у пациентов без ауто-IFN-AT. Высокие концентрации ауто-IFN-AT (более 100 нг/мл) у пациентов с COVID-19 могут рассматриваться как предиктор неблагоприятного исхода заболевания.

Ключевые слова: *SARS-CoV-2, иммунитет, интерфероны, аутоантитела, иммунодефицит, COVID-19.*

Адрес для переписки:
Сторожева Майя Викторовна
129090, Россия, Москва, Б. Сухаревская пл., 3,
ГБУЗ НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского
Департамента здравоохранения города Москвы.
Тел.: 8 903 562-67-96.
E-mail: Mayya.storozheva@yandex.ru

Contacts:
Mayya V. Storozheva
129090, Russian Federation, Moscow, Bolshaya Sukharevskaya sq., 3,
N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine
of Moscow Healthcare Department.
Phone: +7 903 562-67-96.
E-mail: Mayya.storozheva@yandex.ru

Для цитирования:
Петриков С.С., Боровкова Н.В., Попугаев К.А., Сторожева М.В., Квасников А.М., Годков М.А. Аутоантитела к интерферону альфа и их значение при COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 2. С. 279–287. doi: 10.15789/2220-7619-AAA-1789

Citation:
Petrikov S.S., Borovkova N.V., Popugaev K.A., Storozheva M.V., Kvasnikov A.M., Godkov M.A. Anti-interferon alpha autoantibodies and their significance in COVID-19 // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 2, pp. 279–287. doi: 10.15789/2220-7619-AAA-1789

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-AAA-1789

ANTI-INTERFERON ALPHA AUTOANTIBODIES AND THEIR SIGNIFICANCE IN COVID-19

Petrikov S.S., Borovkova N.V., Popugaev K.A., Storozheva M.V., Kvasnikov A.M., Godkov M.A.

N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of Moscow Healthcare Department, Moscow, Russian Federation

Abstract. During the last two years, treatment of patients with novel coronavirus infection COVID-19 remains an urgent health problem. Interferon proteins are known to play a significant role in antiviral immunity. Some pathological conditions are accompanied by production of neutralizing autologous immunoglobulins against own host interferons (auto-IFN-Abs). There is evidence that autoantibodies against interferons alpha and omega are detected in patients with life-threatening course of COVID-19 pneumonia. The aim of our study was to analyze prevalence of autoantibodies against interferon alpha in patients with COVID-19 coronavirus infection and assess their impact on clinical course of the disease. We examined 70 patients with severe COVID-19, who received inpatient treatment at the intensive care units. Serum autoantibodies against interferon alpha were determined on day 8–50 after disease onset by using solid-phase enzyme immunoassay (ELISA). Patients were divided into 2 groups: those with and without (group 2) autoantibodies against interferon alpha (group 1). Anti-COVID serum from 57 donors was used a control. Among patients, autoantibodies against interferon alpha were detected in 13 (18%) subjects, which level ranged from 26.8 to 1000 ng/ml. Among donors, auto-IFN-Abs were detected in 5 (8.8%) subjects at trace concentrations (from 1.65 to 12.0 ng/ml). Respiratory failure developed significantly more often in patients with auto-IFN-Abs. While analyzing laboratory parameters, it was noted that the concentration of C-reactive protein was significantly higher in the group of patients with auto-IFN-Abs. Mortality rate of patients with high auto-IFN-Abs levels was 60%. In conclusion, it was found that serum autoantibodies against IFN alpha in COVID-19 patients caused lung damage that significantly more often required hardware respiratory support, so comparable by duration with it for patients without auto-IFN-Abs. High concentrations of auto-IFN-Abs (more than 100 ng/ml) in patients with COVID-19 can be considered as a predictor of unfavorable disease outcome.

Key words: *SARS-CoV-2, immunity, interferons, autoantibodies, immunodeficiency, COVID-19.*

Врожденные генетические нарушения и дефицит интерферонов (IFN) являются важными факторами, предрасполагающими к тяжелому поражению вирусными патогенами, в том числе вирусом SARS-CoV-2 [10]. Коронавирусная инфекция, вызываемая вирусом SARS-CoV-2, является высококонтагиозной и может поражать людей всех национальностей и возрастных категорий. В качестве клеточного входа SARS-CoV-2 использует рецепторы ангиотензинпревращающего фермента II (АПФ II). В первую очередь поражению вирусом подвержены рецепторы слизистой оболочки век, носовой и ротовой полости. Кроме того, рецепторы АПФ II присутствуют на моноцитах, макрофагах, эпителиальных клетках трахеи, бронхов, альвеол, энтероцитах и клетках эндотелия сосудов [4]. На этапе проникновения вируса в клетку происходит презентация вирусного антигена и распознавание вируса рецепторами врожденного иммунитета. Помимо этого, S-гликопротеин SARS-CoV-2 распознается Toll-подобными рецепторами 4 типа, что сопровождается их активацией и приводит к продукции и высвобождению провоспалительных цитокинов и интерферонов за счет активации факторов транскрипции NF-kB и факторов регуляции интерферона (IRF). Интерфероны I и III типа играют решающую роль в противовирусном иммунитете, обеспечивая эффективное удаление вируса. Хотя интерфероны не обладают прямым противовирусным действием, они способны вызывать такие изменения в клетках, которые препятствуют размножению вируса, формированию вирусных частиц и дальнейшему его распространению. В целом интерферон-зависимое подавление трансляции является губительным как для вируса, так и для клетки-хозяина [4, 7]. Кроме того, интерферон лимитирует распространение вирусных частиц путем активации белка p53, что также ведет к апоптотической смерти инфицированной клетки [11, 14]. Другим направлением действия интерферонов является стимуляция иммунной системы для борьбы с вирусами. IFN повышает синтез молекул главного комплекса гистосовместимости I и II классов обеспечивая эффективную презентацию вирусных пептидов цитотоксическим Т-лимфоцитам, натуральным киллерам, а также Т-хелперам.

Клиническая картина COVID-19 складывается не только из прямого вирусного влияния, но и из особенностей ответа организма человека, что обусловливает ее разнообразие в популяции – от бессимптомных форм или бессимптомного носительства до тяжелого течения с высокой вероятностью летального исхода. SARS-CoV-2 кодирует несколько белков, которые подавляют продукцию интерферонов 1 типа в клетках на ранней стадии вирусной инвазии, способствуя быстрому распространению вируса в организме [10]. Одной из наиболее вероятных причин недостаточной и несвоевременной работы врожденного иммунитета при COVID-19 может быть особенность репликации вируса, происходящей внутри клеточных органелл, что предотвращает распознавание вируса цитоплазматическими рецепторами.

Нехватка интерферонов I типа во время ранней инфекции SARS-CoV-2 ведет к усилению воспаления [11]. Важным элементом в патогенезе инфекции является гиперактивация врожденного иммунного ответа без сопутствующего перехода к адаптивному иммунному ответу. Возраст-ассоциированный характер диморфизма симптомов может быть связан с изменением в функциональной активности иммунитета. Связанная со старением Т-клеточная лимфопения, снижение активности нейтрофилов, макрофагов, смещение цитокинового баланса в сторону провоспалительного ответа – все эти факторы усугубляют течение коронавирусной инфекции [10, 12, 15].

Еще одним механизмом снижения противовирусной защиты при коронавирусной инфекции являются аутоантитела к интерферону I типа [2]. Некоторые патологические состояния организма сопровождаются синтезом нейтрализующих аутологичных иммуноглобулинов против собственных интерферонов (ауто-IFN-AT) [3]. Ауто-IFN-AT могут быть диагностированы при различных аутоиммунных заболеваниях, таких как системная красная волчанка, периодическая лихорадка, болезнь Бехчета, подагра, анкилозирующий спондилит, псориатический артрит, болезнь Крона; а также у пациентов, получавших лечение IFNα2 или IFNβ, поскольку данные цитокины являются высокоиммуногенными [13]. Аутоантитела к цитокинам блокируют их биологическую функцию и могут вызывать развитие иммунодефицита, схожего с врожденными генетическими нарушениями. В ряде исследований, опубликованных недавно, были выявлены аутоантитела к интерферонам альфа и омега (IFNα, IFNω) у больных с угрожающим жизни течением пневмонии, вызванной COVID-19 [1, 2, 9]. Однако их клиническое значение неясно.

Целью нашего исследования было провести анализ наличия аутоантител к IFNα у пациентов с коронавирусной инфекцией COVID-19 и оценить их влияние на клиническое течение заболевания.

Материалы и методы

Обследовано 70 пациентов (37 мужчин и 33 женщины) с COVID-19, находившихся на стационарном лечении в отделениях реанимации НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского в период с января по апрель 2021 г. Возраст пациентов варьировал от 36 до 88 лет, медиана составила 68 [55; 74] лет. У всех пациентов наличие вирусного инфицирования SARS-CoV-2 было подтверждено результатом ПЦР-теста. Специфическое вирусное поражение легких и его объем диагностировали по данным компьютерной томографии. Для оценки влияния ауто-IFN-AT на течение заболевания сформировали две группы пациентов с наличием аутоантител (1 группа) и их отсутствием (2 группа). Оценку влияния ауто-IFN-AT проводили на основании сравнения данных тяжести заболевания по шкале NEWS2, длительности пребывания больного в отделении реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) и продолжительности госпитализации, необходимости респираторной поддержки, длительности проводимой искусственной вентиляции легких (ИВЛ), в том числе и неинвазивной ИВЛ (НИВЛ), сопутствующих заболеваний, осложнений основного заболевания, а также лабораторных показателей, таких как активность лактатдегидрогеназы (0,00–247,00 ЕД/л), С-реактивный белок (СРБ) (0,0–3,0 мг/л), фибриноген (1,8–3,5 г/л), D-димер (0,00–0,5 мг/л), содержание лейкоцитов в венозной крови ($4–9 \times 10^9$/л), относительное (19–37%) и абсолютное ($1,1–4,5 \times 10^9$/л) количество лимфоцитов. Оценивали худшие показатели за первые 14 дней от начала заболевания.

В качестве контроля использовали результаты исследования 57 доноров антиковидной плазмы (20 мужчин и 37 женщин), перенесших коронавирусную инфекцию COVID-19 в среднетяжелой форме.

Образцы сыворотки и плазмы для исследования ауто-IFN-AT забирались у доноров плазмы в момент процедуры плазмозаготовки, у пациентов реанимационного отделения в разные сроки от начала заболевания (8–50 сутки от момента первых клинических проявлений). Аутоантитела к IFNα в сыворотке крови определяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) наборами Human Anti-IFN alpha ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Количество детектируемых аутоантител к IFNα в исследуемых образцах выражали в нг/мл.

Статистический анализ данных проводился с помощью пакета программы Statistica 10 (StatSoft, Inc., США). В ходе статистической обработки данных определяли медиану, 1 и 3 квартили, для оценки различий использовали U-критерий Манна–Уитни (кр. M–W) для независимых переменных и критерий Уилкоксона (кр. W) для связанных выборок. Различия значений считали достоверными при уровне значимости более 95% ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Среди 70 обследованных пациентов с инфекцией COVID-19 аутоантитела к IFNα выявили у 13 (18%) человек, из них 7 мужчин и 6 женщин. На рис. 1 представлено распределение больных 1 и 2 групп по объему поражения легких.

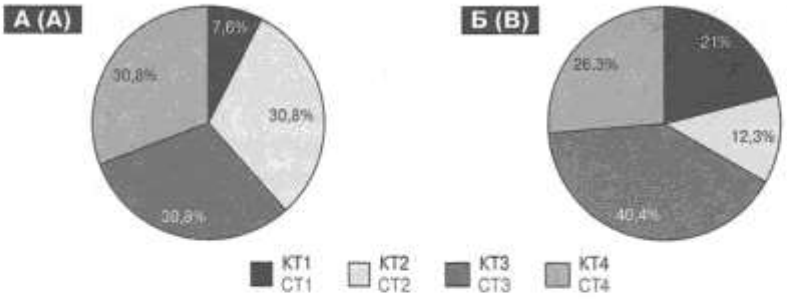

Рисунок 1. Распределение пациентов первой (А) и второй (Б) группы по объему поражения легких по данным компьютерной томографии

Figure 1. Distribution of patients in group 1 (A) and group 2 (B) according to the computed tomography-assessed lung damage volume

Таблица 1. Исходные характеристики, клиническое течение и данные лабораторных исследований пациентов с COVID-19 с ауто-IFN-AT и без ауто-IFN-AT

Table 1. Baseline characteristics, clinical course and laboratory data of patients with COVID-19 with/without auto-IFN-Abs

Показатель Parameter	**Группы больных** Groups of patients		**P**
	1 группа (с ауто-IFN-AT) Group 1 (with auto-IFN-Abs) **n = 13**	**2 группа (без ауто-IFN-AT)** Group 2 (without auto-IFN-Abs) **n = 57**	
Возраст пациентов, лет Age of patients, years	63 [52; 74]	68 [58; 73]	0,215
Пол, м/ж Gender, m/f	7/6	30/27	0,937
NEWS2 при поступлении в стационар NEWS2 upon admission to the hospital	4 [2; 8]	5,5 [3; 7]	0,139
Длительность пребывания в ОРИТ, сут. Duration of stay in the ICU, day	12 [7; 24]	12 [5; 22]	0,510
Продолжительность госпитализации, сут. Length of stay, day	16 [11; 38]	15 [11; 25]	0,862
Сахарный диабет, % случаев Diabetes mellitus, % of cases	4 (30,8%)	22 (38,6%)	0,360
Тромботические осложнения, % случаев Thrombotic complications, % of cases	5 (38,5%)	19 (33,3%)	0,376
ИВЛ, НИВЛ, % случаев Ventilation, non-invasive ventilation, % of cases	**8 (61,5%)**	**18 (31,5%)**	**0,044**
Продолжительность НИВЛ, сут. Duration of non-invasive ventilation, day	5 [4; 14]	3 [2; 10]	0,157
Продолжительность ИВЛ, сут. Duration of ventilation, day	10 [7; 11]	9 [2; 21]	0,524
Лейкоциты, × 10^9/л White blood cells, × 10^9/l	7,1 [5,5; 9,5]	8,2 [4,4; 11,1]	0,639
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	8,2 [6,4; 18,2]	9,1 [3,8; 16,0]	0,593
Лимфоциты, × 10^9/л Lymphocytes, × 10^9/l	0,7 [0,6; 1,5]	0,5 [0,4; 1,0]	0,151
D-димер, мг/л D-dimer, mg/l	0,86 [0,6; 1,2]	0,92 [0,5; 2,1]	0,636
Фибриноген, г/л Fibrinogen, g/l	4,4 [4,0; 4,9]	4,2 [3,0; 4,9]	0,745
СРБ, мг/л CRP, mg/l	**122 [82; 143]**	**47 [28; 112]**	**0,041**
ЛДГ, ЕД/л LDH, UNITS/l	512 [368; 591]	477 [351; 622]	0,870

Несмотря на несколько большее количество пациентов с поражением легких до 25% (КТ1) в группе пациентов без ауто-IFN-AT (1б), доля пациентов с поражением легких более 50% (КТ3 и КТ4) в 1 и 2 группах была сопоставима.

Сравнительный анализ демографических параметров, тяжести течения, исходов заболевания и некоторых лабораторных данных представлен в табл. 1.

Как видно из таблицы, по полу и возрасту, тяжести состояния по шкале NEWS2, наличию сопутствующей патологии, развитию тромботических осложнений значимых различий между пациентами с ауто-IFN-AT и без них не выявлено. В 1 группе умерло 4 (30%) из 13 пациентов, во второй группе — 20 (35%) из 57. Средняя продолжительность госпитализации пациентов в сравниваемых группах значимо не отличалась. Пациенты с аутоантителами к IFNα находились в отделении интенсивной терапии в среднем на 5 суток дольше, чем без ауто-IFN-AT, хотя различия статистически не достоверны. В то же время у пациентов с ауто-IFN-AT значимо чаще развивалась дыхательная недостаточность, что требовало проведения НИВЛ или ИВЛ. Хотя длительность НИВЛ и ИВЛ, потребовавшаяся пациентам 1 и 2 групп, была одинакова.

При анализе лабораторных данных пациентов в 1 и 2 группах не выявили достоверных различий в показателях концентрации лейкоцитов, относительного и абсолютного содержания лимфоцитов. У пациентов обеих групп концентрации D-димера и фибриногена были достоверно увеличены по сравнению с нормой, при этом не выявлено статистически значимой разницы между группами. В то же время концентрация СРБ, маркера воспаления, была достоверно выше в группе пациентов с ауто-IFN-AT и составила 122 [82; 143] мг/мл, тогда как у пациентов без антител — 47 [28; 112] мг/мл.

В качестве группы сравнения были обследованы 57 доноров антиковидной плазмы, перенесших коронавирусную инфекцию COVID-19 в среднетяжелой форме. Среди доноров ауто-IFN-AT были выявлены у 5 (8,8%) человек (трое женщин, двое мужчин) в следовых концентрациях (от 1,65 до 12,0 нг/мл).

Концентрация ауто-IFN-AT у пациентов варьировала от 26,8 до 1000 нг/мл. При этом можно было выделить две разные подгруппы пациентов с уровнем антител до и более 100 нг/мл. Из 13 человек 1 группы у 8 уровень аутоантител к IFNα был низким и составил 31 [27; 40] нг/мл (подгруппа 1а), а у 5 — высоким 990 [440; 1000] нг/мл (подгруппа 1б). Сравнительный анализ этих групп представлен в табл. 2.

Несмотря на то что статистически значимые различия между пациентами с низким и высоким уровнем ауто-IFN-AT из-за небольшого числа наблюдений выявить не удалось, отмечены следующие тенденции. Так, пациенты с высоким уровнем аутоантител к IFNα были старше, у них отмечали более выраженные симптомы дыхательной недостаточности, что требовало проведения НИВЛ или ИВЛ чаще и дольше, чем у больных с низким уровнем ауто-IFN-AT, а также регистрировали более высокие уровни С-реактивного белка и ЛДГ. Одним из критериев тяжелого течения COVID-19 является развитие лимфопении. Однако у пациентов с высоким уровнем аутоантител к IFNα, напротив, отмечали достоверно более высокое содержание лимфоцитов в периферической крови в течение 14 дней от начала заболевания. Вероятно, парадоксальное увеличение лимфоцитов при тяжелом течении COVID-19 обусловлено манифестацией аутоиммунной патологии у пациентов старческого возраста, что проявляется продукцией аутоантител к IFNα в высоком титре.

Летальность у пациентов с низким и высоким содержанием анти-IFN-AT и без них представлена на рис. 2. Среди пациентов с низким содержанием ауто-IFN-AT из 8 человек умер 1 (12,5%), тогда как из 5 пациентов с высоким уровнем аутоантител — 3 (60%). Из-за небольшого количества наблюдений выявить статистически значимую разницу между подгруппами не удалось.

Обсуждение

Интерфероны — общее название ряда белков со сходными свойствами, выделяемых клетками организма в ответ на вторжение вируса. Существует три типа эндогенных интерферонов: к первому типу относят IFNα, IFNβ, IFNω, IFNκ, IFNε; ко второму — IFNγ; к третьему — IFNλ-1, IFNλ-2 и IFNλ-3. Интерфероны I типа, впервые описанные в 1957 году, представляют собой повсеместно экспрессируемые цитокины, которые, посредством их секреции лейкоцитами и плазматическими клетками, способствуют врожденному иммунитету против вирусных инфекций. Несмотря на то что интерфероны регулируют многие процессы нормальной жизнедеятельности организма человека, они являются потенциально иммуногенными, так как имеют пептидную природу и могут запустить процесс синтеза аутологичных антител.

Аутоантитела к интерферонам рассматриваются как аутоиммунный фактор, способный привести к развитию иммунодефицитных состояний [3]. Антитела к отдельным подвидам IFNα и IFNω были выявлены почти у всех пациентов с аутоиммунным полиэндокринным синдромом I типа [13], связанным с нарушением центральной толерантности, опосредованной Т-лимфоцитами. Несмотря на то что

Таблица 2. Демографические параметры, тяжесть течения и данные лабораторных исследований пациентов с низким и высоким уровнем ауто-IFN-AT

Table 2. Demographic parameters, severity of disease course, and data from laboratory studies of patients with low and high auto-IFN-Abs levels

Показатель Parameter	**Группы больных** Groups of patients		**P**
	Подгруппа 1а (ауто-IFN-AT < 100 нг/мл), n = 8 Group 1a (auto-IFN-Abs < 100 ng/ml), n = 8	**Подгруппа 1б (ауто-IFN-AT > 100 нг/мл), n = 5** Group 1b (auto-IFN-Abs > 100 ng/ml), n = 5	
Возраст пациентов, лет Age of patients, years	57 [49; 68]	73 [66; 74]	0,435
Пол, м/ж Gender, m/f	3/5	2/3	0,929
NEWS2 при поступлении в стационар NEWS2 at admission	3,5 [2; 4,3]	8 [3; 9]	0,281
Длительность пребывания в ОРИТ, сут. Length of stay at the ICU, day	10 [7; 27]	12 [11; 19]	0,94
Продолжительность госпитализации, сут. Length of hospitalization, day	14 [11; 39]	16 [11; 19]	0,83
Сахарный диабет, % случаев Diabetes mellitus, % of cases	2 (25%)	2 (40%)	0,569
Тромботические осложнения, % случаев Thrombotic complications, % of cases	3 (37,5%)	2 (40%)	0,929
ИВЛ, НИВЛ, % случаев Ventilation, non-invasive ventilation, % of cases	3 (37%)	3 (60%)	0,429
Продолжительность НИВЛ/ИВЛ, сут. Duration of the ventilation/non-invasive ventilation, day	5 [3; 15]	38 [24; 52]	0,25
Лейкоциты, $\times 10^9$/л White blood cells, $\times 10^9$/l	7,4 [5,4; 9,5]	6,3 [5,5; 9,9]	0,93
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	7,1 [4,8; 12,9]	13,2 [9,7; 19,4]	0,13
Лимфоциты, $\times 10^9$/л Lymphocytes, $\times 10^9$/l	**0,6 [0,4; 0,75]**	**2,35 [1,5; 2,9]**	**0,024**
Фибриноген, г/л Fibrinogen, g/l	4,6 [2,9; 4,9]	4,4 [4,3; 4,6]	0,782
СРБ, мг/л CRP, mg/l	104 [51; 122]	162 [111; 198]	0,153
ЛДГ, ЕД/л LDH, UNITS/l	461 [362; 558]	528 [512; 804]	0,431

Рисунок 2. Летальность у пациентов с тяжелым течением COVID-19 с низким и высоким содержанием ауто-IFN-AT и без них

Figure 2. Mortality rate in patients with severe COVID-19 at low and high or no auto-IFN-Abs levels

интерфероны I типа являются высокоактивными противовирусными молекулами, наличие аутоантител считалось клинически незначимым и не приводило к развитию тяжелых вирусных инфекций, требующих интенсивной терапии [1]. Также наличие ауто-IFN-АТ наблюдается у практически здоровых людей при отсутствии выраженной иммунной патологии. В 2011 году учеными из Египта было обследовано 558 здоровых доноров крови (100 женщин и 458 мужчин). С помощью иммуноферментного анализа (ИФА) аутоантитела против IFNα в низких концентрациях были обнаружены у 43 человек (7,8%), против IFNα-2b — у 3 (0,5%). Комбинированная положительная реакция как на IFNα-1a, так и на IFNα-2b составила 38 (6,9%). Из этих результатов можно сделать вывод, что антитела против IFNα присутствуют примерно у 7% здорового населения [8]. При обследовании доноров антиковидной плазмы в 8,8% случаев нами выявлены аутоантитела к IFNα в минимальных концентрациях 2,35 [1,94; 6,52] нг/мл, что согласуется с данными, полученными египетскими коллегами. Все обследованные нами доноры перенесли коронавирусную инфекцию COVID-19 в среднетяжелой и легкой форме. Нельзя с уверенностью сказать, образовались ли у них ауто-IFN-антитела вследствие перенесенной инфекции или присутствовали ранее в качестве некоторого «бесшумного» аутоиммунного фона.

У пациентов с тяжелым, опасным для жизни течением коронавирусной инфекции COVID-19 аутоантитела к интерферонам I типа определены в нескольких опубликованных недавно исследованиях, как фактор риска неблагоприятного исхода и тяжести течения заболевания [2, 10, 13]. В наиболее крупном из них [2] представлены результаты обследования 987 пациентов с тяжелым течением COVID-19. Аутоантитела к интерферонам I типа (против IFNα2 и/или IFNω) были выявлены у 135 человек (13,7%), при этом не все антитела были способны нейтрализовать соответствующий интерферон. Наличие нейтрализующих ауто-IFN-АТ выявлено у 10% пациентов с тяжелым течением и не обнаружено у больных с бессимптомным или легким заболеванием. В работе испанских исследователей [15] показана зависимость между наличием нейтрализующих антител против IFNα и/или IFNω и более высокими концентрациями С-реактивного белка, а также более низким содержанием лимфоцитов у больных с COVID-19. В проведенном нами исследовании не выявлено различий в относительном и абсолютном содержании лимфоцитов в крови пациентов как с наличием ауто-IFN-АТ, так и без них. Но мы также отметили достоверно более высокие концентрации СРБ у пациентов с аутоантителами к IFNα, что является предиктором тяжелого течения и смерти у больных с COVID-19 [12]. С-реактивный белок является одним из маркеров воспаления, который продуцируется гепатоцитами в ответ на индукцию цитокинами (интерлейкин-1 (IL-1), IL-6, IL-17) [6]. Биологические эффекты С-реактивного белка состоят в активации каскада комплемента, усилении фагоцитоза, индукции выработки цитокинов. Кроме того, за счет сродства к фосфатидилхолину, СРБ способен связываться с поврежденными и апоптотическими клетками, что способствует удалению как разрушенных клеток, так и хроматина, выделившегося из них [5]. Помимо повышения при воспалении, уровень СРБ резко повышается при аутоиммунном процессе и может оказывать не только про-, но и противовоспалительное действие, способствуя защите клеток. Остается невыясненным, с чем связан повышенный уровень СРБ у больных COVID-19 с наличием аутоантител к интерферону альфа. Это может быть связано с манифестацией аутоиммунной патологии и/или с развитием цитокинового шторма вследствие нарушения регуляции иммунного ответа.

В исследовании Р. Конинга и соавт. [9] представлен сравнительный анализ клинического течения, сопутствующей патологии и исходов заболевания у пациентов с COVID-19 с нейтрализующими и ненейтрализующими антителами против IFN I типа. Отмечено, что наличие ненейтрализующих антител у пациентов с ауто-IFN-АТ никак не влияло на течение заболевания COVID-19 по сравнению с пациентами без ауто-IFN-АТ. Кроме того, такие антитела выявлялись у 16% пациентов, проходивших лечение в отделениях интенсивной терапии, несвязанных с COVID-19. В этом же исследовании отмечено, что из 6 пациентов с COVID-19 и наличием нейтрализующих антител против IFN I типа 5 человек умерло. Однако из-за небольшой выборки статистическую значимость влияния нейтрализующих антител к IFN I типа выявить не удалось. В нашем исследовании не предполагалось определение нейтрализующей активности ауто-IFN-АТ, но было выделено две принципиально различные подгруппы пациентов с разной концентрацией аутоантител. У 5 из 70 (7%) определены высокие концентрации аутоантител против IFNα (более 100 нг/мл), троим из них потребовалось проведение ИВЛ, трое умерло. У 8 из 70 (11%) аутоантитела против IFNα присутствовали в незначительных концентрациях (до 100 нг/мл), из них ИВЛ потребовалось только двум пациентам, умер один. Таким образом, можно предположить, что низкие концентрации аутоантител к IFNα не обладают нейтрализующей активностью, не имеют клинического и прогностического значения у больных с COVID-19. Напротив, высокие

концентрации (более 100 нг/мл) аутоантител против IFNα могут рассматриваться как прогностически неблагоприятный фактор течения коронавирусной инфекции.

Остается неясным присутствовали аутоантитела против IFNα у пациентов до инфицирования COVID-19 или появление антител связано с патогенным влиянием вируса на иммунную систему пациентов. В публикации П. Бастарда и соавт. [2] отмечено наличие ауто-IFN-AT в образцах сыворотки двух неродственных пациентов, полученной до инфицирования COVID-19, что, по мнению авторов, свидетельствует в пользу предшествующей аутоиммунной патологии, которая обуславливала тяжелое течение вирусного заболевания. Но выявленные нами ауто-IFN-AT у доноров антиковидной плазмы ставят под сомнение это утверждение, поскольку, несмотря на наличие аутоантител к IFN, все обследованные доноры плазмы перенесли заболевания в легкой или среднетяжелой форме. Гипотеза о возможном влиянии коронавируса на выработку аутоантител к интерферонам требует подтверждения, проведения сравнительного анализа изменения концентрации ауто-IFN-AT у пациентов при прогрессировании или регрессе симптомов заболевания.

Заключение

У пациентов с новой коронавирусной инфекцией, вызванной COVID-19, в 18% случаев в крови выявляются аутоантитела против IFNα. У таких пациентов определяются достоверно более высокие концентрации С-реактивного белка, маркера воспаления и аутоиммунной патологии и предиктора тяжелого течения заболевания. При наличии низких и высоких уровней аутоантител против IFNα пациентам с поражением легких вследствие COVID-19 достоверно чаще требуется проведение искусственной вентиляции легких, в том числе неинвазивной, хотя продолжительность респираторной поддержки сопоставима с таковой у пациентов без ауто-IFN-AT. Высокие концентрации ауто-IFN-AT (более 100 нг/мл) у пациентов с COVID-19 могут рассматриваться как предиктор неблагоприятного исхода заболевания.

Список литературы/References

1. Bastard P., Orlova E., Sozaeva L., Lévy R., James A., Schmitt M.M., Ochoa S., Kareva M., Rodina Y., Gervais A., Voyer T.L., Rosain J., Philippot Q., Neehus A.L., Shaw E., Migaud M., Bizien L., Ekwall O., Berg S., Beccuti G., Ghizzoni L., Thiriez G., Pavot A., Goujard C., Frémond M.L., Carter E., Rothenbuhler A., Linglart A., Mignot B., Comte A., Cheikh N., Hermine O., Breivik L., Husebye E.S., Humbert S., Rohrlich P., Coaquette A., Vuoto F., Faure K., Mahlaoui N., Kotnik P., Battelino T., Trebušak Podkrajšek K., Kisand K., Ferré E.M.N., DiMaggio T., Rosen L.B., Burbelo P.D., McIntyre M., Kann N.Y., Shcherbina A., Pavlova M., Kolodkina A., Holland S.M., Zhang S.Y., Crow Y.J., Notarangelo L.D., Su H.C., Abel L., Anderson M.S., Jouanguy E., Neven B., Puel A., Casanova J.L., Lionakis M.S. Preexisting autoantibodies to type I IFNs underlie critical COVID-19 pneumonia in patients with APS-1. *J. Exp. Med., 2021, vol. 218, no. 7: e20210554. doi: 10.1084/jem.20210554*
2. Bastard P., Rosen L.B., Zhang Q., Michailidis E., Hoffmann H.H., Zhang Y., Dorgham K., Philippot Q., Rosain J., Béziat V., Manry J., Shaw E., Haljasmägi L., Peterson P., Lorenzo L., Bizien L., Trouillet-Assant S., Dobbs K., de Jesus A.A., Belot A., Kallaste A., Catherinot E., Tandjaoui-Lambiotte Y., Le Pen J., Kerner G., Bigio B., Seeleuthner Y., Yang R., Bolze A., Spaan A.N., Delmonte O.M., Abers M.S., Aiuti A., Casari G., Lampasona V., Piemonti L., Ciceri F., Bilguvar K., Lifton R.P., Vasse M., Smadja D.M., Migaud M., Hadjadj J., Terrier B., Duffy D., Quintana-Murci L., van de Beek D., Roussel L., Vinh D.C., Tangye S.G., Haerynck F., Dalmau D., Martinez-Picado J., Brodin P., Nussenzweig M.C., Boisson-Dupuis S., Rodríguez-Gallego C., Vogt G., Mogensen T.H., Oler A.J., Gu J., Burbelo P.D., Cohen J.I., Biondi A., Bettini L.R., D'Angio M., Bonfanti P., Rossignol P., Mayaux J., Rieux-Laucat F., Husebye E.S., Fusco F., Ursini M.V., Imberti L., Sottini A., Paghera S., Quiros-Roldan E., Rossi C., Castagnoli R., Montagna D., Licari A., Marseglia G.L., Duval X., Ghosn J., Tsang J.S., Goldbach-Mansky R., Kisand K., Lionakis M.S., Puel A., Zhang S.Y., Holland S.M., Gorochov G., Jouanguy E., Rice C.M., Cobat A., Notarangelo L.D., Abel L., Su H.C., Casanova J.L. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science, 2020, vol. 370, no. 6515: eabd4585. doi: 10.1126/science.abd4585*
3. Browne S.K. Anticytokine autoantibody-associated immunodeficiency. *Annu. Rev. Immunol., 2014, no. 32, pp. 635–657. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120222*
4. De Veer M.J., Holko M., Frevel M., Walker E., Der S., Paranjape J.M., Silverman R.H., Williams B.R. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J. Leukoc. Biol., 2001, vol. 69, no. 6, pp. 912–920.*
5. Du Clos T.W. C-reactive protein as a regulator of autoimmunity and inflammation. *Arthritis Rheum., 2003, vol. 48, no. 6, pp. 1475–1477. doi: 10.1002/art.11025*
6. Eklund C.M. Proinflammatory cytokines in CRP baseline regulation. *Adv. Clin. Chem., 2009, no. 48, pp. 111–136. doi: 10.1016/s0065-2423(09)48005-3*
7. Fensterl V., Sen G.C. Interferons and viral infections. *Biofactors, 2009, vol. 35, no. 1, pp. 14–20. doi: 10.1002/biof.6*
8. Ibrahim E.H. Anti-IFN autoantibodies are present in healthy Egyptian blood donors at low titer. *Cell Immunol., 2011, vol. 271, no. 2, pp. 365–370. doi: 10.1016/j.cellimm.2011.08.002*
9. Koning R., Bastard P., Casanova J.L., Brouwer M.C., van de Beek D. Autoantibodies against type I interferons are associated with multi-organ failure in COVID-19 patients. *Intens. Care Med., 2021, vol. 47, no. 6, pp. 704–706. doi: 10.1007/s00134-021-06392-4*
10. Ku Ch.L., Chen I.T., Lai M.Z. Infection-induced inflammation from specific inborn errors of immunity to COVID-19. *FEBS J., 2021, vol. 288, no. 17, pp. 5021–5041. doi: 10.1111/febs.15961*

11. Moiseeva O., Mallette F.A., Mukhopadhyay U.K., Moores A., Ferbeyre G. DNA Damage signaling and p53-dependent senescence after prolonged β-interferon stimulation. *Mol. Biol. Cell., 2006, vol. 17, no. 4, pp. 1583–1592. doi: 10.1091/mbc.E05-09-0858*
12. Qu R., Hu L., Ling Y., Fang H., Zhang H., Liang S., He Z., Fang M., Li J., Li X., Chen C. C-reactive protein concentration as a risk predictor of mortality in intensive care unit: a multicenter, prospective, observational study. *BMC Anesthesiol., 2020, vol. 20, no. 1: 292. doi: 10.1186/s12871-020-01207*
13. Rosenberg J.M., Maccari M.E., Barzaghi F., Allenspach E.J., Pignata C., Weber G., Torgerson T.R., Utz P.J, Bacchetta R. Affiliations expand neutralizing anti-cytokine autoantibodies against interferon-α in immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked. *Front. Immunol, 2018, no. 9: 544. doi: 10.3389/fimmu.2018.00544*
14. Takaoka A., Hayakawa S., Yanai H., Stoiber D., Negishi H., Kikuchi H., Sasaki S., Imai K., Shibue T., Honda K., Taniguchi T. Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature, 2003, vol. 424, no. 6948, pp. 516–523. doi: 10.1038/nature01850*
15. Troya J., Bastard P., Planas-Serra L., Ryan P., Ruiz M., de Carranza M., Torres J., Martínez A., Abel L., Casanova J.L., Pujol A. Neutralizing autoantibodies to type I IFNs in >10% of patients with severe COVID-19 pneumonia hospitalized in Madrid, Spain. *J. Clin. Immunol., 2021, vol. 41, no. 5, pp. 914–922. doi: 10.1007/s10875-021-01036-0*

Авторы:
Петриков С.С., д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, директор ГБУЗ НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия;
Боровкова Н.В., д.м.н., руководитель отделения биотехнологий и трансфузиологии ГБУЗ НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия;
Попугаев К.А., д.м.н., руководитель регионального сосудистого центра, зам. директора ГБУЗ НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия;
Сторожева М.В., научный сотрудник отделения биотехнологий и трансфузиологии ГБУЗ НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия;
Квасников А.М., анестезиолог-реаниматолог отделения реанимации и интенсивной терапии ГБУЗ НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия;
Годков М.А., д.м.н., зав. отделом лабораторной диагностики ГБУЗ НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия.

Authors:
Petrikov S.S., RAS corresponding member, PhD, MD (Medicine), Professor, Director of N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of Moscow Healthcare Department, Moscow, Russian Federation;
Borovkova N.V., PhD, MD (Medicine), Head of the Department of Biotechnologies and Transfusiology, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of Moscow Healthcare Department, Moscow, Russian Federation;
Popugaev K.A., PhD, MD (Medicine), Head of the Regional Vascular Center of the State Medical Institution, Deputy Director of N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of Moscow Healthcare Department, Moscow, Russian Federation;
Storozheva M.V., Researcher, Department of Biotechnology and Transfusiology, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of Moscow Healthcare Department, Moscow, Russian Federation;
Kvasnikov A.M., Anesthesiologist and Emergency Physician, Intensive Care Unit, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of Moscow Healthcare Department, Moscow, Russian Federation;
Godkov M.A., PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory Diagnostics Department, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of Moscow Healthcare Department, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 25.08.2021
Принята к печати 03.11.2021

Received 25.08.2021
Accepted 03.11.2021

Инфекция и иммунитет
2022, Т. 12, № 2, с. 288–298

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2022, vol. 12, no. 2, pp. 288–298

СНИЖЕНИЕ УРОВНЯ β-ДЕФЕНЗИНА-2 В ДЕСНЕВОЙ ЖИДКОСТИ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ПРЕДИКТОР РАЗВИТИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПАРОДОНТА

Е.А. Тихомирова[1], В.Г. Атрушкевич[1], Е.В. Линник[2], М.В. Коноплева[2], И.В. Зудина[3]

[1] ФГБОУ ВО Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова Минздрава РФ, Москва, Россия
[2] ФГБУ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ, Москва, Россия
[3] ФГБОУ ВО Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского Минобрнауки РФ, г. Саратов, Россия

Резюме. β-дефензин-2 (HBD-2) является белком врожденного иммунитета, обеспечивающим первую линию защиты слизистой оболочки полости рта от внедрения патобионтов. HBD-2 продуцируется эпителиальными клетками и фибробластами десны в условиях воспаления. Предполагается, что нарушение секреции этого дефензина может играть решающую роль в развитии воспалительных заболеваний пародонта (ВЗП). Цель исследования состояла в сравнении уровней HBD-2 в десневой жидкости и/или содержимом пародонтальных карманов у пациентов с катаральным гингивитом (КГ), агрессивным пародонтитом (АП), хроническим генерализованным пародонтитом (ХГП) и у лиц без клинических признаков ВЗП (Контроль). В исследовании приняли участие 142 человека (45,0±1,03 лет), проживающих в городе Москве, среди которых было 11 человек с КГ (35,7±3,69 лет), 43 человека с АП (35,4±0,84 лет), 71 человек с ХГП (54,4±0,86 лет) и 17 человек с клинически здоровым пародонтом (36,1±2,92 лет). Клиническое состояние тканей пародонта устанавливали в процессе пародонтологического и рентгенологического обследования пациентов. Образцы десневой жидкости и содержимого пародонтальных карманов собирали с помощью бумажных штифтов в зубодесневой борозде и в пародонтальных карманах 8 зубов обеих челюстей. Концентрацию (С) β-дефензина-2 определяли методом иммуноферментного анализа (ELISA Kit for Defensin Beta 2, Cloud-Clone Corp., США). Значимость различий между показателями устанавливали с помощью U-критерия Манна–Уитни (U), критерия Краскела–Уоллиса (H) с проведением апостериорного множественного попарного сравнения методом Дуасса–Стила–Кричлоу–Флигнера (W). Наличие связи между показателями, а также ее тесноту оценивали используя коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r_s). Критический уровень значимости был принят $p \leq 0,05$. Настоящее исследование показало, что прогрессирование патологических воспалительных процессов в тканях пародонта сопровождается резким падением концентрации HBD-2 в клиническом материале пациентов ($H = 42,8$, $df = 3$, $p < 0,001$). Так, концентрация HBD-2 в десневой жидкости лиц с клинически здоровым пародонтом (группа

Адрес для переписки:
Тихомирова Екатерина Александровна
127473, Россия, Москва, Делегатская ул., 20/1, ФГБОУ ВО Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова Минздрава РФ.
Тел.: 8 926 163-23-25.
E-mail: lukaly1990@mail.ru

Contacts:
Ekaterina A. Tikhomirova
127473, Russian Federation, Moscow, Delegatskaya str., 20/1, A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry.
Phone: +7 926 163-23-25.
E-mail: lukaly1990@mail.ru

Для цитирования:
Тихомирова Е.А., Атрушкевич В.Г., Линник Е.В., Коноплева М.В., Зудина И.В. Снижение уровня -дефензина-2 в десневой жидкости как потенциальный предиктор развития воспалительных заболеваний пародонта // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 2. С. 288–298. doi: 10.15789/2220-7619-DBD-1754

Citation:
Tikhomirova E.A., Atrushkevich V.G., Linnik E.V., Konopleva M.V., Zudina I.V. Decreased beta-defensin-2 level in the gingival crevicular fluid as a potential predictor for developing inflammatory periodontal diseases // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 2, pp. 288–298. doi: 10.15789/2220-7619-DBD-1754

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-DBD-1754

контроля) колебалась в пределах от 225 до 1720 пг/мл (C = 738 [477; 1114] пг/мл). У больных КГ медианное значение концентрации HBD-2 составляло 242 [42,5; 610] пг/мл (C_{min} = 19 пг/мл, C_{max} = 1000 пг/мл). У пациентов с пародонтитом оно опускалось до критически низкого уровня: $C_{АП}$ = 54 [3; 195] пг/мл (C_{min} = 0, C_{max} = 478 пг/мл) и $C_{ХГП}$ = 25,5 [0; 125] пг/мл (C_{min} = 0, C_{max} = 298 пг/мл). Таким образом, уровень HBD-2 в десневой жидкости может рассматриваться в качестве потенциального предиктора развития ВЗП.

Ключевые слова: *β-дефензины, HBD-2 (Human beta-defensin-2), пародонтит, гингивит, десневая жидкость, иммуноферментный анализ.*

DECREASED BETA-DEFENSIN-2 LEVEL IN THE GINGIVAL CREVICULAR FLUID AS A POTENTIAL PREDICTOR FOR DEVELOPING INFLAMMATORY PERIODONTAL DISEASES

Tikhomirova E.A.[a], Atrushkevich V.G.[a], Linnik E.V.[b], Konopleva M.V.[b], Zudina I.V.[c]

[a]*A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russian Federation*
[b]*Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation*
[c]*Saratov State University, Saratov, Russian Federation*

Abstract. β-defensin-2 (HBD-2) is a peptide of innate immunity that provides the first defence line in the oral mucosa against invading pathobionts. Under inflammatory conditions, epithelial cells and gingival fibroblasts produce HBD-2. The defective defensin secretion may play a crucial role in the development of inflammatory periodontal diseases. The study was aimed at comparing HBD-2 levels in the gingival fluid and/or periodontal pockets in patients with dental plaque-induced gingivitis (PG), aggressive periodontitis (AgP), chronic generalized periodontitis (CP) and in the periodontally healthy subjects (Control). We examined 142 patients (45.0±1.03 years) residing in Moscow, including 11 patients with PG (35.7±3.69 years), 43 patients with AgP (35.4±0.84 years), 71 patients with CP (54.4±0.86 years) and 17 controls (36.1±2.92 years). We assessed the periodontal tissue condition in all patients during the periodontal and X-ray examination. The samples of the gingival crevicular fluid and periodontal pocket contents were collected from the gingival sulcus and periodontal pockets at 8 teeth of both jaws by paper points. The concentration (C) of β-defensin-2 was determined by enzyme immunoassay (ELISA Kit for Defensin Beta 2, Cloud-Clone Corp., USA). Mann–Whitney U-test (U), the Kruskal–Wallis test (H) and the Dwass–Steel–Critchlow–Fligner post hoc test (W) analyzed a difference significance between the parameters. We estimated the parameter relationship and its power by using the Spearman's rank correlation coefficient (r_s). The critical significance level was $p \leq 0.05$. The current study showed that the progression of the periodontal inflammation is accompanied by sharply decreased HBD-2 concentration in patient samples (H = 42.8, df = 3, $p < 0.001$). Thus, the concentration of HBD-2 in the gingival crevicular fluid of the periodontally healthy subjects (control group) ranged from 225 to 1720 pg/ml (C = 738 [477; 1114] pg/ml). In patients with PG, the median value of peptide concentration was 242 [42.5; 610] pg/ml (C_{min} = 19 pg/ml, C_{max} = 1000 pg/ml). In patients with periodontitis, it declined to critically low levels: C_{AgP} = 54 [3; 195] pg/ml (C_{min} = 0, C_{max} = 478 pg/ml) and C_{CP} = 25.5 [0; 125] pg/ml (C_{min} = 0, C_{max} = 298 pg/ml). Thus, we can consider the level of HBD-2 in the gingival crevicular fluid as a potential predictor for developing inflammatory periodontal diseases.

Key words: *beta-defensins, HBD-2 (Human beta defensin-2), periodontitis, gingivitis, gingival crevicular fluid, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).*

Введение

Главной причиной развития большинства воспалительных заболеваний пародонта (ВЗП) является неспособность системы врожденного (неспецифического) иммунитета адекватно и своевременно купировать воспалительную реакцию, возникшую в пародонтальном комплексе под влиянием различных экзогенных (травма, анатомо-топографические особенности строения зубочелюстной системы, биопленка, дефекты пломбирования и протезирования и др.) и эндогенных (гормональные расстройства, системные заболевания и др.) повреждающих факторов [8, 17].

Первая манифестация ВЗП протекает остро, но, как правило, ограничивается воспалением края десны и не сопровождается потерей зубодесневого соединения или костной ткани (гингивит) [30]. Однако если в результате реализации иммунных эффекторных механизмов в очаге воспаления не удается достичь полной элиминации повреждающего агента, то воспалительный процесс принимает затяжной или хронический характер. В этом случае накопление в зубодесневой борозде различных метаболитов, продуктов распада клеток и деградировавшего межклеточного вещества будет создавать благоприятные условия для размножения протеолитических грамнегативных патогенных и условно-патогенных бактерий, что в конечном итоге приведет к массированной колонизации биопленок патобионтами и постепенному вытеснению ими грампозитивных сахаролитических комменсалов [25]. Возникший бактериальный дисбиоз становится основной

причиной дальнейшего прогрессирования воспаления десны, но уже за счет деструктивного воздействия на ткани различных факторов патогенности и продуктов жизнедеятельности бактерий [31]. У восприимчивых людей данный патологический процесс сопровождается необратимым разрушением структур прикрепления, формированием пародонтальных карманов и резорбцией костной ткани, приводящей к расшатыванию и потере зубов [22]. Заболевание приобретает типичные клинические и морфологические черты пародонтита. В зависимости от динамики и тяжести течения, а также локализации и масштабов вовлечения в процесс тканей пародонта выделяют агрессивную и хроническую формы пародонтита, которые могут иметь генерализованное или локализованное течение [3, 15].

Предполагается, что среди всего многообразия компонентов врожденного иммунного ответа, участвующих в поддержании гомеостаза пародонта, именно β-дефензины могут играть ключевую роль в обеспечении устойчивости к воспалительным заболеваниям полости рта. Эти катионные пептиды, благодаря своим антимикробным свойствам, способны подавлять колонизацию широкого спектра патогенных микроорганизмов, выступая своеобразным биохимическим барьером для микробной инвазии [13]. Кроме того, они выполняют ряд важных иммунотропных функций в очаге воспаления: являются хемоаттрактантами нейтрофилов, моноцитов, Т-клеток, дендритных и тучных клеток [36]; модулируют хемокиновые и цитокиновые ответы [5]; активируют систему комплемента [37]; направляют процесс в сторону адаптивного иммунного Th1-, Th2- или Th17-ответа [28]. Такое мультимодальное действие β-дефензинов позволило им сохранять свою эффективность против инфекционных агентов на протяжении всей эволюции животного мира [35].

В последние десятилетия при проведении клинических исследований было установлено, что клетки десны конститутивно секретируют только β-дефензин-1 (HBD-1), тогда как продукция других β-дефензинов (HBD-2, -3 и -4) индуцируется в ответ на воздействие повреждающих факторов, на различные антигены и цитокины воспаления. Также было показано, что ткани пародонтального комплекса существенно различаются своими уникальными паттернами экспрессии HBD, а нарушение экспрессии β-дефензинов, как правило, приводит к развитию ряда патологических состояний [9].

Очевидно, что установление роли каждого из β-дефензинов в поддержании гомеостаза пародонта будет способствовать лучшему пониманию патогенеза ВЗП, выявлению предикторов риска развития патологических состояний и выбору новых терапевтических стратегий. В недавнем исследовании Costa L. и соавт. (2018) убедительно показали, что у пародонтологически здоровых людей концентрация HBD-1 в десневой жидкости была выше, чем у пациентов с хроническим пародонтитом, тем самым подтвердив гипотезу о важной роли HBD-1 в защите тканей десны при развитии пародонтита [7]. До настоящего времени нет единого мнения относительно роли и характера экспрессии HBD-2 при различных формах ВЗП. В связи с этим цель данного исследования состояла в сравнении содержания HBD-2 в десневой жидкости и/или содержимом пародонтальных карманов у пациентов с катаральным гингивитом (КГ), агрессивным пародонтитом (АП), хроническим генерализованным пародонтитом (ХГП) и у лиц без клинических признаков ВЗП (Контроль).

Материалы и методы

В исследование включено 142 человека в возрасте от 22 до 70 лет, обратившихся за стоматологической помощью на кафедру пародонтологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова (Москва). При пародонтологическом обследовании определяли индекс гигиены (ИГ) по J. Silness и H. Loe (1967), индекс кровоточивости десневых сосочков (PBI) по H.R. Muhlemann (1975), потерю клинического прикрепления десны (CAL, мм) и подвижность зубов по шкале S.C. Miller (1938) в модификации T.J. Flezar (1980). Состояние костной ткани челюстей оценивали по ортопантомограмме, при этом рассчитывали костный индекс (КИ) по M. Fuchs (1946). Диагноз заболевания устанавливали в соответствии с нозологической Международной классификацией болезней 10-го пересмотра, одобренной на 43 сессии Всемирной ассамблеи здравоохранения в мае 1990 г. Диагностика хронического генерализованного пародонтита и агрессивного пародонтита проводилась на основании критериев классификации, принятой Американской академией пародонтологии в 1999 г. [3].

Критерии включения пациентов в группу КГ: наличие воспаления в десне с сохранением целостности зубодесневого прикрепления; отсутствие пародонтальных карманов; отсутствие резорбции костной ткани (КИ = 1). *Критерии включения пациентов в группу АП:* потеря клинического прикрепления более 4 мм; неравномерная резорбция костной ткани, как правило, вертикальная и блюдцеобразная, преимущественно у резцов и первых моляров; быстрое прогрессирование заболевания; возраст манифестации заболевания — до 35 лет. *Критерии включения пациентов в группу ХГП:* потеря кли-

нического прикрепления более 4 мм; наличие относительно равномерной резорбции костной ткани в области по крайней мере четырех участков $^2/_3$ длины корней и более; медленный или умеренный темп прогрессирования заболевания с самопроизвольной ремиссией; возраст пациентов — старше 35 лет. *Критерии включения пациентов в контрольную группу:* отсутствие воспалительных изменений в десне; отсутствие кровоточивости десен либо не более 10% кровоточащих при зондировании пародонтальным зондом участков; глубина зондирования в области зубодесневой борозды ≤ 3 мм; отсутствие патологической подвижности зубов; отсутствие резорбции костной ткани (КИ = 1); отсутствие в анамнезе воспалительных заболеваний пародонта. *Критерии невключения пациентов в исследование:* беременность и период лактации; сопутствующая общесоматическая патология в стадии декомпенсации; прием антибактериальных препаратов в последние 3 месяца. *Критерии исключения пациентов:* отказ пациента от участия в клиническом исследовании.

На основании результатов обследования, в соответствии с критериями включения, невключения, исключения все пациенты были распределены по группам, численность и возрастная структура которых представлены в табл.

Материалом для иммунологического исследования служили жидкость зубодесневой борозды и содержимое пародонтальных карманов. Забор образцов осуществляли с помощью стерильных бумажных штифтов способом, описанным в работе Türkoğlu O. и соавт. [38] с небольшими модификациями. Перед взятием материала тщательно удаляли наддесневой налет, а поверхность зубов и десны изолировали с помощью ватных валиков и подсушивали. Стандартные стерильные коммерческие штифты № 25 с конусностью 02 (Meta Biomed, Южная Корея) помещали в зубодесневую борозду или в пародонтальный карман 8 зубов обеих челюстей и оставляли на 1 мин. Затем штифты с адсорбированным материалом каждого из пациентов объединяли и взвешивали на калиброванных электронных весах Voyager V10640 (Ohaus, США) I класса точности с чувствительностью измерения 0,0001 мг. Массу абсорбированного на этих штифтах вещества определяли путем вычитания массы такого же количества чистых штифтов того же производителя из общей массы штифтов с материалом. Полученную величину преобразовывали в фактический объем (микролитры) по стандартной кривой. Штифты высушивали на воздухе при комнатной температуре, помещали в маркированные пластиковые пробирки (Eppendorf, Германия) и хранили при температуре –18°С без размораживания. Перед проведением анализа пробирки размораживали при комнатной температуре, белок элюировали в 0,5 мл стерильной дистиллированной воды, нейтрализованной фосфатным буфером.

Концентрацию HBD-2 (С, пг/мл) определяли в клинических образцах с помощью набора реагентов ELISA Kit for Defensin Beta 2 (Cloud-Clone Corp., США). Чувствительность набора, заявленная производителем, — ниже 13,2 пг/мл. Оптическую плотность (ОП) измеряли в одноволновом режиме (450 нм) относительно лунки с нулевой концентрацией аналита (бланк). Калибровочную кривую строили на основании ОП семи стандартных растворов: 2000 пк/мл; 1000 пк/мл; 500 пк/мл; 250 пк/мл; 125 пк/мл; 62,5 пк/мл; 31,2 пк/мл. Значения CHBD-2, выходящие за номинальный рабочий диапазон тест-системы (31,2–2000 пк/мл), определяли по калибровочной кривой путем простой экстраполяции.

Статистическую обработку данных осуществляли методами непараметрического анализа с использованием пакетов программ Statistica 13.3, Jamovi 1.1.9.0 и Microsoft Office Excel 2016. Данные были проанализированы на нормальное распределение с помощью теста Шапиро–Уилка. Количественные показатели, отражающие состояние тканей пародонта и возраст участников исследования, в работе представлены в виде M±m, где M — среднеарифметическое значение, а m — стандартная ошибка средней. Значения концентрации HBD-2 представлены в виде Me [Q_1; Q_3], где Me — медиана, Q_1 — первый квартиль, Q_3 — третий квартиль.

Таблица. Численность и возрастная структура групп пациентов

Table. Number and age pattern of patients examined

Группа Group	**Численность, абс. (%)** Number, abs. (%)			**Средний возраст, годы** Mean age, years
	всего total	**муж.** male	**жен.** female	
Контроль Control	17 (100)	4 (23,5)	13 (76,5)	36,1±2,92
ВЗП/IPD	125 (100)	58 (46,4)	67 (53,6)	46,2±1,06
КГ/PG	11 (100)	4 (36,4)	7 (63,6)	35,7±3,69
АП/AgP	43 (100)	22 (51,2)	21 (48,8)	35,4±0,84
ХГП/CP	71 (100)	32 (45,1)	39 (54,9)	54,4±0,86
Все обследованные All examined patients	142 (100)	62 (43,7)	80 (56,3)	45,0±1,03

Примечания. ВЗП — воспалительные заболевания пародонта, КГ — катаральный гингивит, АП — агрессивный пародонтит, ХГП — хронический генерализованный пародонтит.

Notes. IPD — inflammatory periodontal diseases, PG — plaque-induced gingivitis, AgP — aggressive periodontitis, CP — chronic generalized periodontitis.

Значимость различий между двумя независимыми выборками устанавливали с помощью U-критерия Манна–Уитни, между несколькими независимыми выборками — с помощью Н-критерия Краскела–Уоллиса с проведением апостериорного множественного попарного сравнения методом Дуасса–Стила–Кричлоу–Флигнера (W-критерий). Для выявления связи между показателями и оценки ее тесноты использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r_S). Критический уровень значимости был принят за 0,05.

Результаты

Клинико-рентгенологическое обследование. К локальным факторам, провоцирующим развитие ВЗП, прежде всего относится плохая гигиена полости рта. При проведении осмотра оказалось, что гигиеническое состояние полости рта у пациентов с ВЗП ($ИГ_{КГ}$ = 1,14±0,14, $ИГ_{АП}$ = 1,71±0,12, $ИГ_{ХГП}$ = 1,77±0,09) было существенно хуже, чем в группе контроля ($ИГ_{Контроль}$ = 0,31±0,07) (рис. 1). Сравнение этих групп с помощью Н-критерия Краскела–Уоллиса выявило статистически значимые различия: Н = 43,3, df = 3, p < 0,001. В ходе апостериорных попарных сравнений методом Дуасса–Стила–Кричлоу–Флигнера было установлено, что значения ИГ статистически значимо различались в группах Контроль и КГ (W = –5,44, p < 0,001), Контроль и АП (W = –7,76, p < 0,001), Контроль и ХГП (W = 8,35, p < 0,001), КГ и ХГП (W = 3,86, p < 0,032). Не было выявлено существенных различий по этому показателю между группами КГ и АП (W = –3,11, p = 0,123), АП и ХГП (W = 0,595, p = 0,975).

По сравнению с группой контроля у большинства пациентов с ВЗП отмечалась кровоточивость десны, причем степень выраженности данного симптома варьировала в зависимости от формы заболевания ($PBI_{КГ}$ = 0,75±0,13; $PBI_{АП}$ = 1,33±0,12; $PBI_{ХГП}$ = 1,50±0,09). Однако анализ данных показал, что существенные различия в значениях PBI (H = 52,4, df = 3, p < 0,001) были выявлены только между группами КГ и ХГП (W = 4,32, p < 0,012).

Использование Н-критерия Краскела–Уоллиса при сравнении групп по показателю патологической подвижности зубов, а также по индексу CAL подтвердило наличие статистически значимых различий: $H_{подвижность}$ = 57,2, df = 3, p < 0,001 и H_{CAL} = 67,9, df =3, p < 0,001. Так, у представителей группы контроля и у пациентов, страдающих КГ, патологическая подвижность зубов полностью отсутствовала, а наблюдаемая в отдельных случаях потеря клинического прикрепления десны выражалась в виде локальных

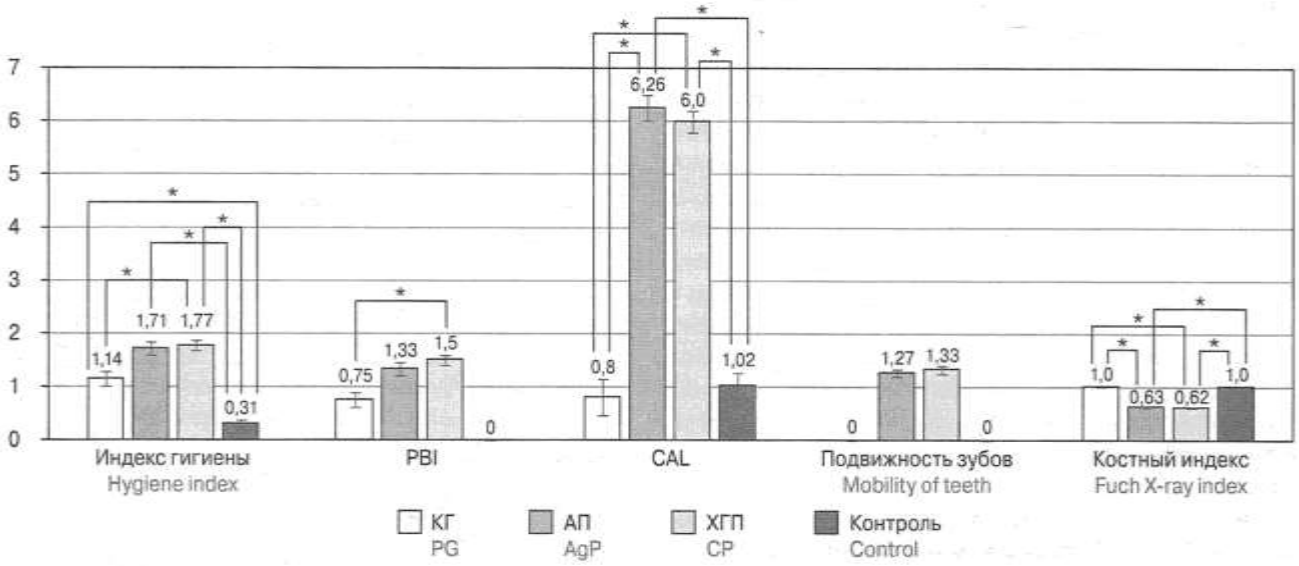

Рисунок 1. Усредненные по группам значения стоматологических показателей у пациентов с катаральным гингивитом (КГ), агрессивным пародонтитом (АП), хроническим генерализованным пародонтитом (ХГП) и у лиц без клинических проявлений ВЗП (Контроль) до начала исследования

Figure 1. Group-averaged values of dental parameters in patients with plaque-induced gingivitis (PG), aggressive periodontitis (AgP), chronic generalized periodontitis (CP) and in the periodontally healthy subjects (Control) before the study

Примечание. * — значимые различия между группами по критерию W, тест Дуасса–Стила–Кричлоу–Флигнера (p ≤ 0,05). PBI — папиллярный индекс кровоточивости; CAL — потеря клинического прикрепления десны.

Note. * — significant differences between groups according to the W criterion, Dwass–Steel–Critchlow–Fligner test (p ≤ 0.05). PBI — papilla bleeding index; CAL — clinical attachment loss.

рецессий ($CAL_{КГ}$ = 0,80±0,35 мм; $CAL_{Контроль}$ = 1,02±0,25 мм). Апостериорные сравнения этих двух групп не обнаружили статистически значимых различий по индексу CAL (W = 0,80, p = 0,943). В группах АП и ХГП, наоборот, отмечались высокие значения CAL (6,26±0,24 мм и 6,00±0,21 мм соответственно) и патологической подвижности зубов (1,27±0,07 мм и 1,33±0,08 мм соответственно). Различия данных показателей в группах пациентов с пародонтитом были несущественными ($W_{подвижность}$ = 0,70, p = 0,960; W_{CAL} = –1,65, p = 0,650). Тем не менее статистически значимые различия наблюдались между следующими группами: Контроль и АП ($W_{подвижность}$ = –8,30, p < 0,001; W_{CAL} = –8,49, p < 0,001); Контроль и ХГП ($W_{подвижность}$ = –8,30, p < 0,001; W_{CAL} = –9,02, p < 0,001); КГ и АП ($W_{подвижность}$ = –6,72, p < 0,001; W_{CAL} = –7,19, p < 0,001); КГ и ХГП ($W_{подвижность}$ = 6,60, p < 0,001; W_{CAL} = 7,52, p < 0,001).

Участки резорбции костной ткани определялись на ортопантомограммах только у пациентов с АП и ХГП ($КИ_{АП}$ = 0,63±0,02; $КИ_{ХГП}$ = 0,62±0,01). Различия между этими двумя группами по данному показателю были статистически не значимы (W = 0,15, p = 1,000).

Определение уровня HBD-2 в клиническом материале. Концентрация HBD-2 в десневой жидкости у лиц с клинически здоровым пародонтом колебалась в пределах от 225 до 1720 пг/мл (C = 738 [477; 1114] пг/мл) (рис. 2). У лиц, страдающих ВЗП, наоборот, наблюдалось существенное падение уровня этого дефензина в клиническом материале. Так, если в образцах, полученных от пациентов с КГ, медианное значение концентрации HBD-2 составляло 242 [42,5; 610] пг/мл (C_{min} = 19 пг/мл, C_{max} = 1000 пг/мл), то у большинства пациентов с пародонтитом эта величина опускалась до критически низкого уровня: $C_{АП}$ = 54 [3; 195] пг/мл (C_{min} = 0, C_{max} = 478 пг/мл) и $C_{ХГП}$ = 25,5 [0; 125] пг/мл (C_{min} = 0, C_{max} = 298 пг/мл). В обследованных группах отмечались статистически значимые различия по этому показателю (H = 42,8, df =3, p < 0,001). В частности, существенные различия в концентрации HBD-2 были выявлены между группами Контроль и АП (W = 8,14, p < 0,001); Контроль и ХГП (W = –8,91, p < 0,001); Контроль и КГ (W = 4,02, p = 0,023); КГ и ХГП (W = –5,37, p = 0,018). Не установлены статистически значимые различия между группами: КГ и АП (W = 3,49, p = 0,065); АП и ХГП (W = –3,02, p = 0,141).

Не обнаружена какая-либо связь между уровнем HBD-2 и полом обследованных (U = 2233, p > 0,05). Однако, в отличие от контрольной группы, у пациентов с ВЗП была выявлена слабая отрицательная корреляция между концентрацией HBD-2 и возрастом (r_s = –0,2, p < 0,05), индексом гигиены по Silness и Loe (r_s = –0,22, p < 0,05), индексом кровоточивости (r_s = –0,3, p < 0,05) и подвижностью зубов (r_s = –0,19, p < 0,05). У пациентов с пародонтитом наблюдалась слабая отрицательная корреляция между концентрацией HBD-2 и индексом кровоточивости (r_s = –0,25, p < 0,05).

Обсуждение

Клинико-рентгенологическое обследование 142 пациентов терапевтического отделения КДЦ МГМСУ им. А.И. Евдокимова (Москва) продемонстрировало значительное ухудше-

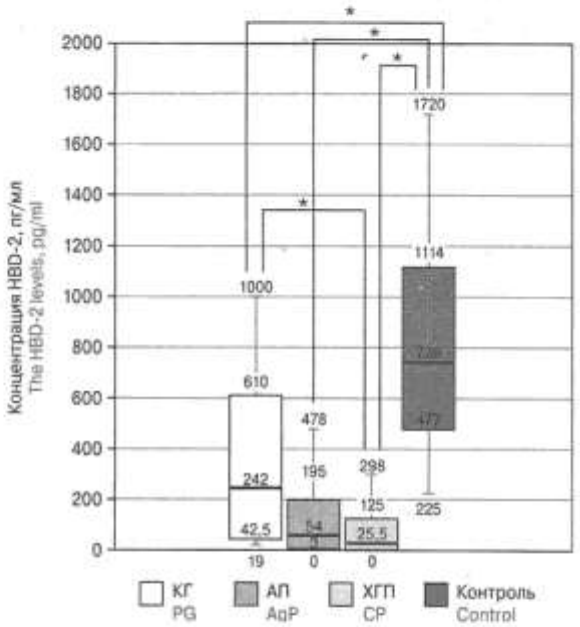

Рисунок 2. Концентрация HBD-2 (пг/мл) в клиническом материале пациентов с катаральным гингивитом (КГ), агрессивным пародонтитом (АП), хроническим генерализованным пародонтитом (ХГП) и у лиц без клинических проявлений воспалительных заболеваний пародонта (Контроль)

Figure 2. The HBD-2 concentration (pg/ml) in samples from patients with plaque-induced gingivitis (PG), aggressive periodontitis (AgP), chronic generalized periodontitis (CP) and in the periodontally healthy subjects (Control)

Примечание. * — значимые различия между группами по критерию W, тест Дуасса–Стила–Кричлоу–Флигнера (p ≤ 0,05). Верхняя и нижняя грани прямоугольников — значения верхних и нижних квартилей, пересекающая прямоугольники прямая — медиана, верхние и нижние отрезки — максимальные и минимальные значения.

Note. * — significant differences between groups according to the W criterion, Dwass–Steel–Critchlow–Fligner test (p ≤ 0.05). The upper and lower edges of the rectangles denote the values of the upper and lower quartiles, the line intersecting the rectangle denotes the median, the upper- and lower-line segments denote the maximum and minimum values.

ние всех стоматологических показателей у лиц, страдающих ВЗП, по сравнению с группой контроля. Полученные данные логично укладываются в общие представления о типовом течении ВЗП и свидетельствуют о снижении иммунологической резистентности тканей пародонта у больных гингивитом и пародонтитом.

Иммунологическое исследование биологического материала (жидкости десневой борозды/содержимого пародонтальных карманов) позволило установить, что у пародонтологически здоровых людей уровень HBD-2 был значительно выше, чем у пациентов с ВЗП. Так, медианная концентрация HBD-2 у лиц из контрольной группы в 3 раза превышала таковую у пациентов с КГ, а также в 13,7 раз у пациентов с АП и в 25,5 раз у пациентов с ХГП (рис. 2). Максимальная концентрация HBD-2 у отдельных лиц из группы контроля достигала 1720 пг/мл, тогда как в группе АП эта величина, как правило, не превышала 478 пг/мл и практически полностью совпадала со значением концентрации нижней квартили группы контроля (477 пг/мл). В группе ХГП преобладали еще более низкие значения концентрации HBD-2. У 106 (93%) пациентов с АП и ХГП концентрация этого белка была ниже 500 пг/мл, а у 53 (46,5%) — ниже 31,2 пк/мл, то есть ниже первой калибровочной точки тест-системы, использованной в данной работе. Таким образом, есть основания полагать, что падение концентрации HBD-2 в десневой жидкости пациентов ниже 500 пг/мл является предиктором неблагоприятного исхода воспалительного процесса в тканях пародонта.

Полученные нами результаты полностью согласуются с данными целого ряда исследовательских групп, которые ранее уже сообщали о более высокой экспрессии мРНК HBD-2 в здоровых тканях десны по сравнению с тканями, пораженными ВЗП [4, 19, 26]. Настоящее исследование впервые показывает существование аналогичной закономерности относительно концентрации этого белка в десневой жидкости у пациентов с различным клиническим состоянием тканей пародонта.

В этом контексте следует заострить внимание на том факте, что Costa L. и соавт. (2018) выявили более высокий уровень β-дефензина-1 в десневой жидкости у пародонтологически здоровых людей по сравнению со страдающими ВЗП [7]. Аналогичные результаты были получены Brancatisano F. и соавт. (2011) в отношении β-дефензина-3 [6]. Для объяснения причин более низкой продукции β-дефензинов у больных ВЗП в настоящий момент предлагается несколько гипотез.

Прежде всего, это явление связывают с иммунным старением, когда у пожилых людей с возрастом начинают развиваться структурно-функциональные изменения в иммунной системе [11]. В нашем исследовании действительно была выявлена слабая отрицательная корреляция между концентрацией HBD-2 и возрастом у пациентов с ВЗП ($r_s = -0,2$, $p < 0,05$). Особенно явно данная тенденция проявлялась в более старшей возрастной группе — у лиц, страдающих ХГП. Однако если обратиться к данным, представленным в табл., то станет очевидно, что низкая концентрация HBD-2 обнаруживалась также и у пациентов с КГ и АП, у которых средний возраст составлял лишь 35,7±3,69 и 35,4±0,84 лет соответственно.

Кроме того, необходимо учитывать, что при возрастном снижении эффективности адаптивного иммунного ответа реакция на длительную антигенную нагрузку осуществляется за счет усиленной стимуляции врожденного иммунитета [2], а, как известно, дефензины являются неотъемлемой частью именно врожденного иммунитета. Поэтому достаточно сложно, на наш взгляд, объяснить снижение уровня β-дефензина в тканях пародонта исключительно возрастными изменениями иммунного статуса больных ВЗП.

Согласно второй гипотезе, β-дефензины могут быть разрушены или инактивированы протеолитическими ферментами некоторых пародонтопатогенных бактерий [29]. Проведенный у больных ВЗП транскриптомный анализ поддесневых микробиомов показал повышенную экспрессию генов протеолитических ферментов, которые многие асахаролитические, анаэробные и грамотрицательные бактерии используют для обеспечения своих пищевых потребностей [10]. В частности, было показано, что по меньшей мере 85% всей протеолитической активности в отношении белков хозяина, в том числе и в отношении α- и β-дефензинов, у *P. gingivalis* приходится на трипсиноподобные протеазы и гингипаины. Комплекс протеиназ *T. denticola*, включающий белки PrtP, PcrA1 и PrcA2 и липопротеин PrcB, активен против биоактивных пептидов хозяина, сывороточного альбумина, трансферрина, IgA и IgG и различных провоспалительных цитокинов.

В нашем исследовании также была установлена умеренная связь между низким уровнем продукции HBD-2 и неудовлетворительным гигиеническим состоянием полости рта у пациентов с ВЗП ($r_s = -0,41$, $p < 0,05$). Тем не менее эта гипотеза требует более тщательного изучения, поскольку по данным многочисленных исследовательских групп приблизительно у 10–35% людей в полости рта могут длительное время персистировать различные виды пародонтопатогенных бактерий, не вызывая при этом каких-либо клинических проявлений ВЗП.

Наконец, существует мнение, что пациенты с ВЗП изначально имеют низкую секрецию β-дефензинов из-за различных вариаций в генах, ответственных за продукцию этих антимикробных пептидов. В пользу данной версии свидетельствуют результаты двух независимых исследований Jaradat S. и соавт. (2013) и Öztürk A. и соавт. (2021), которые показали, что концентрация HBD-2 в сыворотке крови у больных хроническим пародонтитом была статистически значимо ниже, чем у лиц с клинически здоровым пародонтом [21, 34]. Поскольку секреция β-дефензина-2 не является конституциональной, а индуцируется, как правило, инфекцией и воспалением, то при генерализованном поражении тканей пародонта, вызванным агрессией патобионтов, следовало бы ожидать возрастания уровня этого белка как в воспаленных тканях, так и в сыворотке крови пациентов. И если содержание β-дефензина-2 в пародонте может снижаться локально, как предполагают, из-за протеазной активности пародонтопатогенов, то в сыворотке крови его концентрация должна сохраняться на повышенном уровне. По всей видимости, наблюдаемое в обеих работах низкое содержание β-дефензина-2 в сыворотке крови больных ВЗП является отражением каких-то не установленных до настоящего времени генетических или эпигенетических модификаций ДНК.

В литературе представлены многочисленные доказательства того, что опосредованные генетическими причинами колебания уровня продукции β-дефензина-2 могут негативно отражаться на восприимчивости человека к различным заболеваниям [16, 21, 24].

Не так давно Kurt-Bayrakdar S. и соавт. (2020) выявили статистически значимую ассоциацию ($p = 0,0004$) нуклеотидной замены в гене DEFB4A T→G (rs1339258595) с развитием хронического пародонтита, причем у лиц с мутантным аллелем G вероятность ВЗП была в 2,86 раза выше, чем у носителей аллеля T [23]. Исследователи подчеркнули, что эта ассоциация не зависела от специфической для пародонтита ковариаты — возраста ($p = 0,004$). Важность данного замечания обусловлена результатами ряда эпидемиологических исследований, в которых показано, что у более молодых пациентов среди всех причинных факторов развития ВЗП генетический вклад может достигать 50%, в то время как у пожилых пациентов он составляет не более 25% [27]. Поскольку средний возраст, при котором наблюдается первая клиническая манифестация агрессивного пародонтита, составляет 30 лет [32], то, по всей видимости, контрольные группы должны включать индивидуумов без клинических проявлений ВЗП и старше данного возраста. Однако, по данным ВОЗ, заболеваемость ВЗП в группе «35–44 лет» крайне высока и в отдельных странах достигает 98% [33]. Поэтому перед исследователями регулярно встает проблема отбора в контрольные группы достаточного числа добровольцев, соответствующих этим критериям.

Kurt-Bayrakdar S. и соавт. (2020) решили данную проблему, включив в контрольную группу всех пациентов, у которых в анамнезе не было пародонтита и не выявлялись участки с уровнем потери клинического прикрепления и глубиной зондирования более 3 мм, но никаких ограничений в отношении количества налета или наличия клинических признаков гингивита не применялось. В результате такого отбора средний возраст пациентов из контрольной группы ($n = 100$) составлял 32,4±10,46 года.

В большинстве работ других исследователей, также изучавших связь экспрессии β-дефензинов с риском развития ВЗП и наличием генетических модификаций, средний возраст пациентов в группе контроля, как правило,

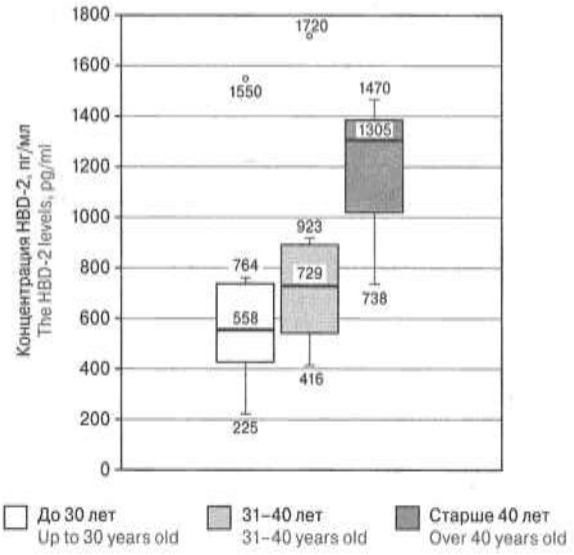

Рисунок 3. Уровень HBD-2 (пг/мл) в десневой жидкости у представителей группы контроля в зависимости от их возрастной категории: до 30 лет (n = 7), от 31 до 40 лет (n = 7) и старше 40 лет (n = 3)

Figure 3. The HBD-2 level (pg/ml) in the gingival crevicular fluid in the control group, according the members age: under 30 years (n = 7), aged 31 to 40 years (n = 7) as well as over 40 years (n = 3)

Примечание. Пересекающая прямоугольники прямая — медиана, верхние и нижние отрезки — максимальные и минимальные значения.

Note. The line intersecting the rectangle denotes the median, the upper- and lower-line segments denote the maximum and minimum values.

был значительно ниже 30 лет, что не исключает вероятности течения ВЗП на субклиническом уровне (латентного течения). Возможно, именно это стало причиной противоречивых сведений относительно экспрессии генов β-дефензинов в группах людей с клинически здоровым пародонтом и страдающих ВЗП. Так, некоторые исследователи показали, что экспрессия мРНК HBD-2 в здоровых тканях десны была выше, чем в пораженных пародонтитом [4, 18], другие, наоборот, регистрировали более высокие уровни экспрессии HBD-2 у пациентов с ВЗП [12, 34, 39, 40]. В нашем исследовании впервые показано, что наиболее высокие концентрации HBD-2 в биологическом материале отмечались у пациентов из контрольной группы. Средний возраст в этой группе составлял 36,1±2,92 лет, а уровень HBD-2 в десневой жидкости в отдельных случаях достигал 1450–1720 пг/мл.

Для того чтобы более глубоко исследовать характер изменения уровня HBD-2 в десневой жидкости клинически здоровых лиц в зависимости от возраста, группу контроля (n = 17) разделили на 3 возрастные подгруппы (рис. 3).

Как видно из рис. 3, у более молодых лиц (возрастная подгруппа до 30 лет) концентрация HBD-2 в десневой жидкости оказалась самой низкой, причем значения этого показателя были более близки к таковым у пациентов из группы КГ ($U = 19$, $p > 0,05$) (рис. 2). Лишь у одного молодого человека (мужчина, 25 лет) концентрация HBD-2 достигала значения 1550 пг/мл. У представителей группы контроля в возрасте от 31 до 40 лет средний уровень HBD-2 в образцах был выше, чем у лиц в возрастной категории до 30 лет ($U = 16$, $p > 0,05$) и у пациентов из группы КГ ($U = 12$, $p < 0,05$). У лиц из группы контроля старше 40 лет средний уровень HBD-2 был выше, чем у лиц моложе 30 лет ($U = 4$, $p > 0,05$) и у лиц в возрасте от 31 до 40 лет ($U = 6$, $p > 0,05$), а также по сравнению с тем же показателем в группе КГ ($U = 12$, $p < 0,05$).

По всей видимости, причиной заниженных средних значений концентрации HBD-2 у более молодых участников группы контроля является присутствие среди них лиц с клинически здоровым пародонтом, но с высоким риском развития ВЗП в будущем. В этой связи следует отметить, что было бы вполне разумно установить возрастные ограничения для участников группы контроля, чтобы снизить ее неоднородность и гарантировать отсутствие лиц со скрытым течением ВЗП.

Таким образом, вполне вероятно, что существует связь между полиморфизмом генов β-дефензинов и предрасположенностью человека к ВЗП. Если данное предположение верно, то детальный анализ распределения аллельных вариантов в пределах этих генов позволит выявить мутации, которые можно будет в дальнейшем использовать в качестве предикторов развития ВЗП.

Заключение

Настоящее исследование показало, что прогрессирование патологических воспалительных процессов в тканях пародонта сопровождается резким падением концентрации HBD-2 в десневой жидкости. Полученные результаты удачно дополняют данные Costa L. и сотр. (2018) и Brancatisano F. и соавт. (2011), установивших тот факт, что у пациентов с ВЗП уровень двух других β-дефензинов (HBD-1 и HBD-3) в десневой жидкости значительно ниже, чем у лиц с клинически здоровым пародонтом [6, 7]. Вероятно, что именно генетически обусловленное снижение концентрации β-дефензинов в тканях пародонта создает идеальные условия для разрушения десневого барьера, роста патобионтов и развития аберрантной воспалительной реакции.

Решить проблему дефицита этих антимикробных белков позволит применение синтетических аналоговых препаратов [20]. На данный момент в мире известны только три антимикробных пептида, которые были одобрены FDA: грамицидин, даптомицин и колистин. Критическими недостатками, с которыми сталкиваются фармакологические компании при разработке таких пептидов в качестве терапевтических средств, являются химическая нестабильность, склонность к агрегации, короткий период полувыведения, чувствительность к pH и к концентрации солей в биологических жидкостях, высокие затраты при производстве. В связи с этим более перспективным видится применение миметиков дефензинов, сконструированных на основе различных поликатионных гетеросахаридов, таких как хитозан [14]. В частности, в ряде клинических исследований уже доказан высокий лечебный эффект солевой формы хитозана, обусловленный как пролонгированной санацией пародонтальных карманов, так и иммунотропным действием на эффекторы врожденного иммунитета [1].

Не исключено, что именно компенсация дефицита β-дефензинов с помощью различного вида миметиков в ближайшем будущем станет ключевым терапевтическим методом, нацеленным на восстановление гомеостаза в пародонте, поддержание функциональной активности врожденного иммунитета и снижение бремени инфекционных заболеваний полости рта. Однако при этом не следует забывать, что в инициации ВЗП существенную роль также играют общее состояние здоровья, дурные привычки и факторы окружающей среды.

Список литературы/References

1. Зудина И.В., Булкина Н.В., Иванов П.В., Ведяева А.П., Иванова Е.В. Противовоспалительный эффект аскорбата хитозана в комплексной терапии заболеваний пародонта // Российский стоматологический журнал. 2013. Т. 17, № 2. С. 16–19. [Zudina I.V., Bulkina N.V., Ivanov P.V., Vedyaeva A.P., Ivanova E.V. Antiinflammatory effect of ascorbate chitosan in the periodontal disease treatment. *Rossiyskiy stomatologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Dentistry, 2013, vol. 17, no. 2, pp. 16–19. (In Russ.)*]
2. Ширинский В.С., Ширинский И.В. Полиморбидность, старение иммунной системы и системное вялотекущее воспаление – вызов современной медицине // Медицинская иммунология. 2020. Т. 22, № 4. С. 609–624. [Shirinsky V.S., Shirinsky I.V. Polymorbidity, ageing of immune system and lowgrade systemic inflammation: a challenge for modern medicine. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2020, vol. 22, no. 4, pp. 609–624. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/15630625PAO2042*
3. Armitage G.C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann. Periodontol., 1999, vol. 4, no. 1: 1. doi: 10.1902/annals.1999.4.1.1*
4. Bissell J., Joly S., Johnson G.K., Organ C.C., Dawson D., McCray P.B. Jr, Guthmiller J.M. Expression of beta-defensins in gingival health and in periodontal disease. *J. Oral Pathol. Med., 2004, vol. 33, no. 5, pp. 278–285. doi: 10.1111/j.0904-2512.2004.00143.x*
5. Boniotto M., Jordan W.J., Eskdale J., Tossi A., Antcheva N., Crovella S., Connell N.D., Gallagher G. Human beta-defensin 2 induces a vigorous cytokine response in peripheral blood mononuclear cells. *Antimicrob. Agents Chemother., 2006, vol. 50, no. 4, pp. 1433–1441. doi: 10.1128/AAC.50.4.1433-1441.2006*
6. Brancatisano F.L., Maisetta G., Barsotti F., Esin S., Miceli M., Gabriele M., Giuca M.R., Campa M., Batoni G. Reduced human beta defensin 3 in individuals with periodontal disease. *J. Dent. Res., 2011, vol. 90, no. 2, pp. 241–245. doi: 10.1177/0022034510385686*
7. Costa L.C.M., Soldati K.R., Fonseca D.C., Costa J.E., Abreu M.H.N.G., Costa F.O., Zandim-Barcelos D.L., Cota L.O.M. Gingival crevicular fluid levels of human beta-defensin 1 in individuals with and without chronic periodontitis. *J. Periodontal. Res., 2018, vol. 53, no. 5, pp. 736–742. doi: 10.1111/jre.12558*
8. Cugini C., Ramasubbu N., Tsiagbe V.K., Fine D.H. Dysbiosis from a microbial and host perspective relative to oral health and disease. *Front. Microbiol., 2021, vol. 12: 617485. doi: 10.3389/fmicb.2021.617485*
9. Dommisch H., Jepsen S. Diverse functions of defensins and other antimicrobial peptides in periodontal tissues. *Periodontol. 2000, 2015, vol. 69, no. 1, pp. 96–110. doi: 10.1111/prd.12093*
10. Duran-Pinedo A.E., Chen T., Teles R., Starr J.R., Wang X., Krishnan K., Frias-Lopez J. Community-wide transcriptome of the oral microbiome in subjects with and without periodontitis. *ISME J., 2014, vol. 8, no. 8, pp. 1659–1672. doi: 10.1038/ismej.2014.23*
11. Ebersole J.L., Dawson D.A. 3rd, Emecen Huja P., Pandruvada S., Basu A., Nguyen L., Zhang Y., Gonzalez O.A. Age and periodontal health — immunological view. *Curr. Oral Health Rep., 2018, vol. 5, no. 4, pp. 229–241. doi: 10.1007/s40496-018-0202-2*
12. Ertugrul A.S., Sahin H., Dikilitas A., Alpaslan N.Z., Bozoğlan A., Tekin Y. Gingival crevicular fluid levels of human beta-defensin-2 and cathelicidin in smoker and non-smoker patients: a cross-sectional study. *J. Periodontal. Res., 2014, vol. 49, no. 3, pp. 282–289. doi: 10.1111/jre.12105*
13. Fruitwala S., El-Naccache D.W., Chang T.L. Multifaceted immune functions of human defensins and underlying mechanisms. *Semin. Cell Dev. Biol., 2019, no. 88, pp. 163–172. doi: 10.1016/j.semcdb.2018.02.023*
14. Gegel N.O., Zhuravleva Y.Y., Shipovskaya A.B., Malinkina O.N., Zudina I.V. Influence of chitosan ascorbate chirality on the gelation kinetics and properties of silicon-chitosan-containing glycerohydrogels. *Polymers, 2018, vol. 10, no. 3: 259. doi: 10.3390/polym10030259*
15. Graetz C., Mann L., Krois J., Sälzer S., Kahl M., Springer C., Schwendicke F. Comparison of periodontitis patients' classification in the 2018 versus 1999 classification. *J. Clin. Periodontol., 2019, vol. 46, no. 9, pp. 908–917. doi: 10.1111/jcpe.13157*
16. Groth M., Wiegand C., Szafranski K., Huse K., Kramer M., Rosenstiel P., Schreiber S., Norgauer J., Platzer M. Both copy number and sequence variations affect expression of human DEFB4. *Genes Immun., 2010, vol. 11, no. 6, pp. 458–466. doi: 10.1038/gene.2010.19*
17. Hajishengallis G., Chavakis T., Lambris J.D. Current understanding of periodontal disease pathogenesis and targets for host-modulation therapy. *Periodontol. 2000, 2020, vol. 84, no. 1, pp. 14–34. doi: 10.1111/prd.12331*
18. Hamanaka Y., Nakashima M., Wada A., Ito M., Kurazono H., Hojo H., Nakahara Y., Kohno S., Hirayama T., Sekine I. Expression of human beta-defensin 2 (hBD-2) in Helicobacter pylori induced gastritis: antibacterial effect of hBD-2 against Helicobacter pylori. *Gut., 2001, vol. 49, no. 4, pp. 481–487. doi: 10.1136/gut.49.4.481*
19. Hosokawa I., Hosokawa Y., Komatsuzawa H., Goncalves R.B., Karimbux N., Napimoga M.H., Seki M., Ouhara K., Sugai M., Taubman M.A., Kawai T. Innate immune peptide LL-37 displays distinct expression pattern from beta-defensins in inflamed gingival tissue. *Clin. Exp. Immunol., 2006, vol. 146, no. 2, pp. 218–225. doi: 10.1111/j.1365-2249.2006.03200.x*
20. Huan Y., Kong Q., Mou H., Yi H. Antimicrobial peptides: classification, design, application and research progress in multiple fields. *Front. Microbiol., 2020, vol. 11: 582779. doi: 10.3389/fmicb.2020.582779*
21. Jaradat S.W., Hoder-Przyrembel C., Cubillos S., Krieg N., Lehmann K., Piehler S., Sigusch B.W., Norgauer J. Beta-defensin-2 genomic copy number variation and chronic periodontitis. *J. Dent. Res., 2013, vol. 92, no. 11, pp. 1035–1040. doi: 10.1177/0022034513504217*
22. Könönen E., Gursoy M., Gursoy U.K. Periodontitis: a multifaceted disease of tooth-supporting tissues. *J. Clin. Med., 2019, vol. 8, no. 8: 1135. doi: 10.3390/jcm8081135*
23. Kurt-Bayrakdar S., Ozturk A., Kara N. DEFB4A promoter polymorphism is associated with chronic periodontitis: a case-control study. *Genet. Test. Mol. Biomarkers, 2020, vol. 24, no. 3, pp. 113–119. doi: 10.1089/gtmb.2019.0218*
24. Kusano K., Abiko Y., Nishimura M., Arakawa T., Takeshima M., Fujimoto A., Takuma T., Kaku T. Single-nucleotide polymorphism (SNP) in β-defensin 2 in a Japanese population and an effect of -1029 SNP on promoter activity. *Oral Sci. Int., 2005, vol. 2, no. 2, pp. 80–84. doi: 10.11277/osi.2.80*

25. Lamont R.J., Koo H., Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat. Rev. Microbiol., 2018, vol. 16, no. 12, pp. 745–759. doi: 10.1038/s41579-018-0089-x*
26. Liu J., Chen J., Du X., Hu L., Chen L. The expression of hBDs in the gingival tissue and keratinocytes from healthy subjects and periodontitis patients. *Arch. Oral Biol., 2014, vol. 59, no. 2, pp. 193–198. doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.11.007*
27. Loos B.G., Van Dyke T.E. The role of inflammation and genetics in periodontal disease. *Periodontol. 2000, 2020, vol. 83, no. 1, pp. 26–39. doi: 10.1111/prd.12297*
28. Machado L.R., Ottolini B. An evolutionary history of defensins: a role for copy number variation in maximizing host innate and adaptive immune responses. *Front. Immunol., 2015, vol. 6: 115. doi: 10.3389/fimmu.2015.00115*
29. Mohanty R., Asopa S.J., Joseph M.D., Singh B., Rajguru J.P., Saidath K., Sharma U. Red complex: polymicrobial conglomerate in oral flora: a review. *J. Family Med. Prim. Care, 2019, vol. 8, no. 11, pp. 3480–3486. doi: 10.4103/jfmpc.jfmpc_759_19*
30. Murakami S., Mealey B.L., Mariotti A., Chapple I.L.C. Dental plaque-induced gingival conditions. *J. Clin. Periodontol., 2018, vol. 45, no. 20, pp. S17–S27. doi: 10.1111/jcpe.12937*
31. Naginyte M., Do T., Meade J., Devine D.A., Marsh P.D. Enrichment of periodontal pathogens from the biofilms of healthy adults. *Sci. Rep., 2019, vol. 9, no. 1: 5491. doi: 10.1038/s41598-019-41882-y*
32. Nath S.G., Raveendran R. "What is there in a name?": a literature review on chronic and aggressive periodontitis. *J. Indian Soc. Periodontol., 2011, vol. 15, no. 4, pp. 318–322. doi: 10.4103/0972-124X.92561*
33. Nazir M., Al-Ansari A., Al-Khalifa K., Alhareky M., Gaffar B., Almas K. Global prevalence of periodontal disease and lack of its surveillance. *Sci. World J., 2020: 2146160. doi: 10.1155/2020/2146160*
34. Öztürk A., Kurt-Bayrakdar S., Avci B. Comparison of gingival crevicular fluid and serum human beta-defensin-2 levels between periodontal health and disease. *Oral Dis., 2021, vol. 27, no. 4, pp. 993–1000. doi: 10.1111/odi.13597*
35. Peschel A., Sahl H.G. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat. Rev. Microbiol., 2006, vol. 4, no. 7, pp. 529–536. doi: 10.1038/nrmicro1441*
36. Semple F., Dorin J.R. β-Defensins: multifunctional modulators of infection, inflammation and more? *J. Innate Immun., 2012, vol. 4, no. 4, pp. 337–348. doi: 10.1159/000336619*
37. Stover C.M. Editorial: antimicrobial peptides and complement – maximising the inflammatory response. *Front. Immunol., 2015, vol. 6: 491. doi: 10.3389/fimmu.2015.00491*
38. Türkoğlu O., Emingil G., Kütükçüler N., Atilla G. Evaluation of gingival crevicular fluid adrenomedullin and human neutrophil peptide 1–3 levels of patients with different periodontal diseases. *J. Periodontol., 2010, vol. 81, no. 2, pp. 284–291. doi: 10.1902/jop.2009.090517*
39. Vardar-Sengul S., Demirci T., Sen B.H., Erkizan V., Kurulgan E., Baylas H. Human β defensin-1 and -2 expression in the gingiva of patients with specific periodontal diseases. *J. Periodontal Res., 2007, vol. 42, no. 5, pp. 429–437. doi: 10.1111/j.1600-0765.2006.00964.x*
40. Yong X., Chen Y., Tao R., Zeng Q., Liu Z., Jiang L., Ye L., Lin X. Periodontopathogens and human β-defensin-2 expression in gingival crevicular fluid from patients with periodontal disease in Guangxi, China. *J. Periodontal Res., 2015, vol. 50, no. 3, pp. 403–410. doi: 10.1111/jre.12220*

Авторы:

Тихомирова Е.А., аспирант кафедры пародонтологии ФГБОУ ВО Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова Минздрава РФ, Москва, Россия;

Атрушкевич В.Г., д.м.н., профессор кафедры пародонтологии ФГБОУ ВО Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова Минздрава РФ, Москва, Россия;

Линник Е.В., младший научный сотрудник лаборатории медиаторов и эффекторов иммунитета, отдел иммунологии ФГБУ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ, Москва, Россия;

Коноплева М.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории медиаторов и эффекторов иммунитета, отдел иммунологии ФГБУ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ, Москва, Россия;

Зудина И.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФГБОУ ВО Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского Минобрнауки РФ, г. Саратов, Россия.

Authors:

Tikhomirova E.A., Postgraduate Student, Department of Periodontology, Microbiology and Virology, A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russian Federation;

Atrushkevich V.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Periodontology, A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russian Federation;

Linnik E.V., Junior Researcher, Laboratory of Immune System Mediators and Effectors, Department of Immunology, Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Konopleva M.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Immune System Mediators and Effectors, Department of Immunology, Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Zudina I.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, Microbiology and Virology, Saratov State University, Saratov, Russian Federation.

Поступила в редакцию 29.06.2021
Принята к печати 30.10.2021

Received 29.06.2021
Accepted 30.10.2021

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2022, vol. 12, no. 2, pp. 299–305

Инфекция и иммунитет
2022, Т. 12, № 2, с. 299–305

ИММУНОДЕПРЕССИВНЫЕ И ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПРИ ИНФЕКЦИОННОЙ АЛЛЕРГИИ

Л.К. Добродеева, А.В. Самодова

ФГБУН Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики им. академика Н.П. Лаверова Уральского отделения РАН, г. Архангельск, Россия

Резюме. Заболеваемость инфекционной аллергией растет преимущественно за счет инфицирования *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, с усилением аллергического фона дрожжеподобными грибами рода *Candida*. Частота инфицирования сегодня принимает угрожающие масштабы и не имеет тенденции к снижению. Золотистый стафилококк является, безусловно, патогенным, вырабатывает сильнейшие экзотоксины, обладающие свойствами цитолизина, способного нарушить целостность любой клеточной стенки, разрушает эпителиоциты, повреждая слизистые оболочки любых органов, в том числе и кишечника, в котором накапливается при любой локализации стафилококкового воспаления. При этом почти в 90% случаев аллергических реакций ставится диагноз «атопический дерматит», поскольку при инфекционной аллергии в ряде случаев увеличивается содержание IgE. Механизм патогенетического действия реагинов реализуется путем повторного связывания антигенов с фиксированными на мембранах тучных клеток и базофилов IgE, вследствие чего происходит перекрестное сшивание FcR1 и выделение вазоактивных медиаторов, ответственных за развитие ранней фазы аллергии. Концентрации IgE, составляя всего 0,002% от общего содержания в крови иммуноглобулинов у практически здорового человека, могут оставаться невысокими при диагнозах «атопическая бронхиальная астма», «атопический дерматит», «аллергический риноконъюнктивит» и т. д. Концентрации IgE повышаются не только при атопии, но и при онкопатологии, аутоиммунных болезнях, общем охлаждении и дефиците содержания IgA. При аллергических реакциях регистрируется увеличение содержания внеклеточного пула различных рецепторных структур. Представляет интерес сравнительный анализ соотношения частоты реакций IgE и шеддинга CD23 при инфекционной аллергии различной этиологии. Цель исследования — установить роль внеклеточного пула CD23 в патогенетических механизмах инфекционной аллергии. Обследовано 678 практически здоровых на момент обследования человек (женщин — 545, мужчин — 133) и 1481 больной с диагнозом «инфекционная аллергия», проживающих в Архангельской области. Установлено, что у больных со стафилококковой инфекцией происходит значительное усугубление симптомокомплекса патологических реакций с формированием анемии, нейтропении и дефицита фагоцитарной защиты. Патологические реакции при инфекционной аллергии сопровождаются резким увеличением содержания sCD23 с аномально высокими их концентрациями (> 200 нг/мл) в 51,7% случаев, что сопровождается увеличением содержания в крови IL-10 и реагинов в 21,43 и 35,7% случаев соответственно на фоне дефицита фагоцитарной защиты в 85,7% и накопления ЦИК в 92,86%. Параллельное уве-

Адрес для переписки:
Добродеева Лилия Константиновна
163000, Россия, г. Архангельск, пр. Ломоносова, 249,
ФГБУН Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики им. академика Н.П. Лаверова УрО РАН.
Тел.: 8 (818) 265-29-92.
E-mail: dobrodeevalk@mail.ru

Contacts:
Liliya K. Dobrodeeva
163000, Russian Federation, Arkhangelsk, Lomonosov pr., 249,
N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences.
Phone: +7 (818) 265-29-92.
E-mail: dobrodeevalk@mail.ru

Для цитирования:
Добродеева Л.К., Самодова А.В. Иммунодепрессивные и патогенетические механизмы при инфекционной аллергии // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 2. С. 299–305. doi: 10.15789/2220-7619-IAP-1680

Citation:
Dobrodeeva L.K., Samodova A.V. Immunodepressive and pathogenetic mechanisms in infectious allergy // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 2, pp. 299–305. doi: 10.15789/2220-7619-IAP-1680

Работа выполнена в рамках программы фундаментальных научных исследований ФГБУН ФИЦКИА УрО РАН, № гос. регистрации темы 122011800217-9.

The work was carried out within the program of fundamental scientific research of the N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, state registration No. 122011800217-9.

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-IAP-1680

личение концентрации sCD23 и IgE ассоциировано с повышением содержания Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, активированных Т-клеток с рецептором к IL-2 и молекул главного комплекса гистосовместимости класса II.

Ключевые слова: *sCD23, IgE, IL-10, Т-хелперы, цитотоксические Т-лимфоциты, активированные Т-лимфоциты, дефицит фагоцитарной защиты, циркулирующие иммунные комплексы, инфекционная аллергия.*

IMMUNODEPRESSIVE AND PATHOGENETIC MECHANISMS IN INFECTIOUS ALLERGY

Dobrodeeva L.K., Samodova A.V.

N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Arkhangelsk, Russian Federation

Abstract. The incidence of infectious allergy has been growing mainly due to infection with *Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, Klebsiella pneumoniae*, with enhancing allergic background by yeast-like fungi of the genus *Candida*. The frequency of infection has currently become a threat without tending to decline. Undoubtedly, *Staphylococcus aureus* is a pathogenic species producing highly powerful exotoxins exerting properties of cytolysin capable of disrupting the integrity of any cell wall, destroying epithelial cells, damaging mucous membranes in any organ, including the intestines, wherein it becomes accumulated at any location of staphylococcal inflammation. At the same time, almost 90% of cases of allergic reactions are diagnosed with atopic dermatitis because IgE level in some cases of infectious allergy is increased. The mechanism of the pathogenetic action of reagins is realized by re-binding of antigens to IgE fixed on mast cell and basophil surface resulting in FcR1 cross-linking and release of vasoactive mediators responsible for developing early phase of allergy. IgE concentrations, accounting for only 0.002% of the total blood immunoglobulins in an apparently healthy person, may remain low in atopic bronchial asthma, atopic dermatitis, allergic rhinoconjunctivitis, etc. IgE level is increased not only in atopy, but also in oncopathology, autoimmune diseases, whole body cooling and IgA deficiency. In allergic reactions, an increased level in the extracellular pool of various receptor structures is recorded. Of interest is a comparative analysis of the ratio between frequency of IgE reactions and CD23 shedding in infectious allergies of various etiology. The aim of the study is to establish a role of the CD23 extracellular pool in pathogenetic mechanisms of infectious allergy. There were examined 678 subjects who were at apparently healthy state at the time of the examination, including 545 females and 133 males, as well as 1481 patients with verified infectious allergy who live in the Arkhangelsk Region. It has been established that patients with staphylococcal infection had markedly aggravated symptom complex of pathological reactions linked to anemia, neutropenia and deficiency of phagocytic protection. Pathological reactions in infectious allergies are accompanied by sharply increased level of sCD23 with its abnormally high concentrations (> 200 ng/ml) found in 51.7% of cases paralleled by increased level of serum IL-10 and reagins in 21.43 and 35.7% cases, respectively, along with phagocytic defense deficit observed in 85.7% as well as accumulation of CEC in 92.86%. A parallel increase in level of sCD23 and IgE is associated with increased percentage of T helpers, cytotoxic T lymphocytes, activated T cells expressing IL-2 receptor, along with upregulated of the MHC II molecules.

Key words: *sCD23, IgE, IL-10, T-helpers, cytotoxic T-lymphocytes, activated T-lymphocytes, phagocytic defense deficiency, circulating immune complexes, infectious allergy.*

Введение

Заболеваемость инфекционной аллергией растет преимущественно за счет инфицирования *Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, Klebsiella pneumoniae*, с усилением аллергического фона дрожжеподобными грибами рода *Candida*. При этом почти в 90% случаев аллергических реакций ставится диагноз «атопический дерматит», поскольку при инфекционной аллергии в ряде случаев увеличивается содержание IgE [5]. Механизм патогенетического действия реагинов реализуется путем повторного связывания антигенов с фиксированными на мембранах тучных клеток и базофилов IgE, вследствие чего происходит перекрестное сшивание FcR1 и выделение вазоактивных медиаторов, ответственных за развитие ранней фазы аллергии [4]. Концентрации IgE, составляя всего 0,002% от общего содержания в крови иммуноглобулинов у практически здорового человека, могут оставаться невысокими при диагнозах «атопическая бронхиальная астма», «атопический дерматит», «аллергический риноконъюнктивит» и т. д. Концентрации IgE повышаются не только при атопии, но и при онкопатологии, аутоиммунных болезнях, общем охлаждении и дефиците содержания IgA [1, 8, 9, 10, 11]. При аллергических реакциях регистрируется увеличение содержания внеклеточного пула различных рецепторных структур [8]. Представляет интерес сравнительный анализ соотношения частоты реакций IgE и шеддинга CD23 при инфекционной аллергии различной этиологии. В связи с вышесказанным целью работы является установление роли внеклеточного пула CD23 в патогенетических механизмах инфекционной аллергии.

Материалы и методы

В исследование были включены жители Архангельской области Российской Федерации от рождения и до 30 лет. В работе представлены результаты обследования 678 практически здоровых на момент обследования человек (545 женщин и 133 мужчин) и 1481 больных с диагнозом «инфекционная аллергия». Все исследования проводились с согласия волонтеров и в соответствии с требованиями документа «Хельсинкская декларация Всемирной медицинской ассоциации. Этические принципы проведения медицинских исследований с участием человека в качестве субъекта» (1964 г., с изм. и доп. от 2013 г.).

Количество клеток лейкограммы, моноцитограммы, лимфоцитограммы, нейтрограммы подсчитывали в мазках крови, окрашенных методом по Романовскому–Гимзе; моноцитограмму определяли по О.Н. Григоровой (1956), лимфоцитограмму — по методу И.А. Кассирского (1970), нейтрограмму — по методу Й. Тодорова (1968). Фагоцитарную активность нейтрофилов изучали с помощью тест-набора химической компании «Реакомплекс» (г. Чита). Выделение мононуклеаров из периферической крови проводили по методу A. Boymn (1976), фенотипирование лимфоцитов — в непрямой иммунопероксидазной реакции с использованием моноклональных антител («МедБиоСпектр», «Сорбент», Москва) и методом проточной цитометрии с помощью аппарата Epics XL (Beckman Coulter, США), реактивами Immunotech (Beckman Coulter, Франция). В сыворотке крови методом твердофазного ИФА с соответствующими реактивами определяли концентрацию IgA, M, G, E (Seramnum Diagnostica, Германия), содержание цитокинов IL-4, IL-6, IL-10, IFNγ, TNFα (Seramnum Diagnostica, Германия), ЦИК C1Q (Bühlmann, Германия) и ЦИК C3D, C1Q (DiaMetra, Германия), внеклеточного рецептора sCD23 (Bender MedSystems, Германия) на автоматическом иммуноферментном анализаторе Evolis (Bio-Rad, Германия). Математический и статистический анализ результатов исследования проводили на компьютере IBM/AT-Pentium IV с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel 2010 и Statistica 7.0 (StatSoft, США).

Результаты

Наиболее актуальными, на наш взгляд, проблемами, создаваемыми гиперергическими иммунными реакциями, являются проблемы стафилококковой инфекции и кандидоза (табл. 1). Частота инфицирования сегодня принимает угрожающие масштабы и не имеет тенденции к снижению. Частота выделения из кала золотистого стафилококка убедительна и не вызывает сомнений в причастности его к форми-

Таблица 1. Клиническая симптоматика стафилококковой инфекции у детей в зависимости от продолжительности болезни (месяцы)

Table 1. Clinical symptoms of staphylococcal infection in children depending on the duration of the disease (months)

Изучаемые параметры Studying parameters	**Аллергодерматит** Allergic dermatitis **n = 586**	**Назофарингит** Nasopharyngitis **n = 453**	**Бронхопневмония** Bronchopneumonia **n = 256**	**Бронхиальная астма** Bronchial asthma **n = 186**
***S. aureus*, % (кол-во)** *S. aureus*, % (quantity)	91,9 (539)	92,9 (421)	88,7 (227)	87,6 (163)
***S. aureus*, lg/г** *S. aureus*, lg/g	2,86±0,23	2,79±0,26	3,86±0,31	4,21±0,38
Продолжительность Duration	4,56±0,56	4,39±0,63	23,45±2,58	28,28±2,23
Возраст, месяцы Age, months	4,97±0,35	5,64±0,56	31,55±2,24	35,81±1,87
IgE > 100 МЕ/мл, % (кол-во) IgE > 100 IU/ml, % (quantity)	54,3 (318)	54,9 (249)	85,2 (218)	92,5 (172)
Средние IgE, ед/мл Average IgE, U/ml	58,6±2,24	74,2±2,65	136,5±3,23	186,8±3,51
Анемия, % (кол-во) Anemia, % (quantity)	2,39 (14)	2,43 (11)	12,50 (32)	29 (15,59)
Нейтропения, % (кол-во) Neutropenia, % (quantity)	3,93 (13)	4,64 (21)	7,42 (19)	9,14 (17)
Жидкий стул, % (кол-во) Liquid stool, % (quantity)	67,24 (394)	71,74 (325)	38,28 (98)	40,86 (76)
Запоры, % (кол-во) Constipation, % (quantity)	23,03 (135)	26,71 (121)	46,09 (118)	65,69 (122)

рованию указанного в таблице симптомокомплекса. Средние концентрации IgE в случаях их незначительного повышения не превышали 145 ед/мл, в то время как при истинной атопии показатели содержания реагинов колебались в пределах 550–3560 ед/мл.

Наличие большого банка данных и значительный период наблюдений в течение 27 лет позволил нам проанализировать исходы стафилококкового инфицирования с периода новорожденности до периода полового созревания (табл. 2).

Как видно из представленных в таблице данных, проблемы инфекционной аллергии возникают у большинства обследуемых больных с хронической стафилококковой инфекцией, но характерные для атопии, очень высокие уровни содержания реагинов регистрируются исключительно редко. Повышение концентрации IgE ассоциировано с дефицитом IgA, что нами было показано ранее при различных проявлениях аллергии. Опасность заключается в том, что с продолжительностью болезни нарастает частота дефицита фагоцитарной защиты, нейтропении и анемии. Притом течение болезни усугубляется более тяжелыми формами клинического проявления от назофарингита к бронхопневмонии и бронхиальной астме. Золотистый стафилококк не просто сохраняется в кишечнике, он накапливается там и активно размножается. И если в первые годы течения болезни дело ограничивается периодическими нарушениями стула и болями в животе, то в более поздние сроки формируется стойкий симптомокомплекс гастродуоденита, а частота проявлений колита повышается практически в 4 раза. И в то же время сегодня широко распространена идея бессимптомного носительства золотистого стафилококка. Известно, что IgE являются типичными секреторными антителами, поэтому в период дефицита IgA происходит их компенсация реагинами [16].

Таблица 2. Динамика частоты регистрации симптомокомплекса при стафилококковой инфекции (%, кол-во)

Table 2. Dynamics of symptom complex detection frequency in patients with staphylococcal infection (%, quantity)

Симптомокомплекс Symptom complex	**Возраст больных в динамике болезни** Age of patients in the dynamics of the disease			
	до 1 года up to 1 year **n = 254**	**2–3 года** 2–3 years **n = 251**	**10–19 лет** 10–19 years **n = 128**	**25–30 лет** 25–30 years **n = 63**
Атопический дерматит Atopic dermatitis	74,41 (189)	70,12 (186)	67,19 (86)	39,68 (25)
Назофарингит, аденоиды Nasopharyngitis, adenoids	63,21 (15)	95,22 (239)	87,50 (112)	50,79 (32)
Бронхит Bronchitis	19,41 (29)	21,12 (53)	28,91 (37)	34,92 (22)
Бронхиальная астма Bronchial asthma	1,18 (3)	1,99 (5)	16,41 (21)	9,52 (6)
Гастрит, энтерит Gastritis, enteritis	9,84 (25)	14,34 (36)	26,45 (32)	20,63 (13)
Гастродуоденит Gastroduodenitis	3,54 (9)	8,36 (21)	38,28 (49)	39,68 (25)
Колит Colitis	5,91 (15)	9,96 (25)	21,09 (27)	34,92 (22)
Гемоглобин < 110 г/л Hemoglobin < 110 g/l	4,33 (11)	3,98 (10)	13,28 (17)	12,69 (8)
Нейтрофилы < 2,0 × 10^9 кл/л Neutrophils < 2.0 × 10^9 cells/l	7,09 (18)	8,66 (22)	11,72 (15)	14,29 (9)
Дефицит фагоцитов Phagocyte deficiency	9,84 (25)	15,14 (38)	21,11 (46)	25,39 (16)
IgA в крови < 1,2 г/л IgA in the blood < 1.2 g/l	36,22 (92)	45,02 (113)	53,13 (68)	49,21 (31)
IgE > 100 МЕ/мл IgE > 100 IU/ml	33,46 (85)	39,04 (98)	40,63 (52)	41,26 (26)
Среднее содержание IgE, МЕ/мл The average content of IgE, IU/ml	58,6±0,34	54,2±0,69	126,5±1,2	132,8±2,1
Содержание *S. aureus*, lg/г *S. aureus*, lg/g	2,34±0,05	3,82±0,09	3,68±0,11	4,21±0,13

Увеличение концентрации IgE при повышенных уровнях содержания $CD23^+$ (> 0,6 × 10^9 кл/л; в среднем 137,20±3,26 МЕ/мл) выше в 2 раза по сравнению с контролем (78,92±7,87 МЕ/мл) и в 5,4 раза выше (25,2±3,6 МЕ/мл) по сравнению с данными при низком уровне лимфоцитов $CD23^+$ (менее 0,2 × 10^9 кл/л, $p < 0,05$). Патологическим реакциям при инфекционной аллергии сопутствует резкое увеличение содержания sCD23 с аномально высокими их концентрациями (> 200 нг/мл) в 51,7% случаев, что сопровождается увеличением содержания в крови IL-10 и реагинов соответственно в 21,43 и 35,7% случаев на фоне дефицита фагоцитарной защиты в 85,7% и накопления ЦИК в 92,86%. Увеличение концентрации sCD23 (с 46,53±3,53 до 189,45±8,95 нг/мл) при инфекционной аллергии ассоциировано с повышением содержания лейкоцитов (с 5,40±0,59 до 7,08±0,30 × 10^9 кл/л; $p < 0,001$) в периферической венозной крови за счет нейтрофилов (2,88±0,49 до 3,97±0,22 × 10^9 кл/л; $p < 0,001$), моноцитов (с 0,26±0,05 до 0,46±0,04 × 10^9 кл/л; $p < 0,001$), эозинофилов (с 0,10±0,04 до 0,31±0,08 × 10^9 кл/л; $p < 0,001$) и базофилов (с 0,01±0,001 до 0,05±0,03 × 10^9 кл/л; $p < 0,001$) без существенных отличий со стороны лимфоцитов (2,15±0,17 и 2,29±0,12 × 10^9 кл/л). И только при повышении концентраций свободного рецептора к Fc-фрагменту увеличивается содержание IgE (с 78,92±7,87 до 137,20±3,26 МЕ/мл), Т-хелперов (с 0,49±0,05 до 0,63±0,03 × 10^9 кл/л; $p < 0,001$), активированных Т-клеток с рецептором к IL-2 (с 0,37±0,04 до 0,76±0,04 × 10^9 кл/л; $p < 0,001$) и молекул главного комплекса гистосовместимости класса II (с 0,44±0,04 до 0,70±0,03 × 10^9 кл/л; $p < 0,001$), но снижается концентрация цитотоксических Т-лимфоцитов в 1,5 раза (с 0,57±0,07 до 0,37±0,07 × 10^9 кл/л; $p < 0,001$).

Повышенные концентрации реагинов при инфекционной аллергии регистрировали у 35,71% больных, увеличение содержания $CD23^+$ и sCD23 отмечено во всех этих случаях.

Обсуждение

Золотистый стафилококк является, безусловно, патогенным, вырабатывает сильнейшие экзотоксины, обладающие свойствами цитолизина, способного нарушить целостность любой клеточной стенки, разрушает эпителиоциты, повреждая слизистые оболочки любых органов, в том числе и кишечника, в котором накапливается при любой локализации стафилококкового воспаления. Нарастание частоты регистрации активизации антителообразования иммуноглобулинов данного класса происходит по мере увеличения продолжительности стафилококковой инфекции и прямо указывает на зависимость активизации реагинового механизма защиты от длительности инфекции. Частота регистрации анемии нарастает также в зависимости от длительности заболевания и концентрации золотистого стафилококка в кишечнике. Гемолитические свойства золотистого стафилококка известны, появление специфических IgE к энтеротоксинам А и В стафилококка установлено у 50% обследованных детей с атопией [12].

Известно, что многие патогенные бактерии, в то числе и *Staphylococcus aureus*, обусловливают антителообразование Ig данного класса. Повышение концентрации sCD23 ассоциируется со снижением содержания $CD8^+$ и повышением концентраций IL-10, что, вероятно, и взаимосвязано. IL-10 считается основным естественным ингибитором иммунной реакции путем снижения экспрессии гена дифференцировочных молекул Т-, В-лимфоцитов и других клеток [13]. Параллельное повышение внеклеточного sCD23 и IgE объясняется тем, что мембранные формы рецептора сбрасываются только активированными клетками, а, следовательно, продуцентами реагинов. Активизация реагинового механизма усиливает иммунные реакции воспаления участием вазомоторных аминов базофилов и сильнейшего цитотоксического потенциала эозинофилов [12]. На активизацию секреции IgE реагируют нейтрофильные гранулоциты и моноциты, повышаются концентрации ЦИК [C1Q (IgG+IgM) и C3D] с активизацией системы комплемента и хемотаксиса в 92,86% случаев. Другими словами, проявляются все признаки воспаления. Во всех случаях аномально повышенных концентраций sCD23 установлен дефицит фагоцитарной защиты, в общем дефицит активно фагоцитирующих клеток выявлен в 85,71%. Известно, что дефектно низкий хемотаксис выявляется при повышенных уровнях сывороточных реагинов [14] за счет дефекта опсонизации. Реагины как цитофильные антитела ассоциированы преимущественно с секреторной активностью клеток, в том числе нейтрофилов и моноцитов [16]. ЦИК активируют участок, к которому присоединяется С3-компонент, образующиеся при этом С5а вызывают аккумуляцию и активизацию моноцитов, гранулоцитов, в том числе нейтрофилов, что приводит к высвобождению лизосомальных ферментов и продуктов перекисного окисления [3]. При контакте с кластерами миелоидного ряда происходит освобождение различных протеолитических ферментов и активных форм кислорода [7, 18], а также кислых гидролаз, катепсинов и коллагеназ [2]. Биологический смысл этого процесса, вероятно, заключается в удалении с поверхности клеток иммунных комплексов, реагинов, различных аутоантигенов и в данном случае —

во включении внеклеточного пула рецептора к Fc sCD23 в механизм утилизации избытка IgE и ЦИК. Чрезмерная активизация указанных реакций приводит к некрозу клеток и формированию воспаления.

Заключение

Итак, у больных со стафилококковой инфекцией по мере продолжительности нахождения патогенного стафилококка в организме происходит значительное усугубление симптомокомплекса патологических реакций, формирование анемии, нейтропении и дефицита фагоцитарной защиты. При этом нарушение возрастного формирования иммунологической реактивности обусловлено реакцией естественного иммунодепрессанта IL-10 и проявляется дефицитом IgA, низким уровнем активности клеточно-опосредованной цитотоксичности Т-лимфоцитов. Реакции со стороны IgE можно рассматривать в качестве компенсирующих дефицит IgA и недостаточность цитотоксичности $CD8^+$ способностью реагинов усиливать цитотоксичность антитело-зависимым путем. Повышение активности сбрасывания мембранных рецепторов активированными клетками объясняет увеличение внеклеточного пула рецепторных структур и формирование аномально высоких концентраций внеклеточных ЦИК. Необходимо учитывать, что sCD23 блокируют гуморальные IgE, что способствует агломерации клеток, привлечению фагоцитов и активизации системы комплемента [15]. Указанная реакция может быть дополнительным, а иногда и главным, патогенетическим механизмом [17].

Список литературы/References

1. Балашова С.Н., Пашинская К.О. Влияние фоновой нейтропении на иммунные реакции у практически здоровых людей при кратковременном общем охлаждении // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2018. Т. 15, № 2. С. 239–247. [Balashova S.N., Pashinskaya K.O. Influence of background neutropenia on immune responses in practically healthy people with short-term General cooling. *Vestnik Ural'skoi Meditsinskoi Akademicheskoi Nauki = Journal of Ural Medical Academic Science, 2018, vol. 15, no. 2, pp. 239–247. (In Russ.)] doi: 10.22138/2500-0918-2018-15-2-239-247*
2. Бельченко Д.И., Кривошеина Е.Л. Экзоцитарный лизис эритроцитов мегакариоцитами в костномозговых эритрокластических кластерах и ауторозетках крови при остром лимфобластном лейкозе // Гематология и трансфузиология. 1999. Т. 44, № 5. С. 18–21. [Belchenko D.I., Krivosheina E.L. Exocytic lysis of erythrocytes by megakaryocytes in bone marrow erythroclastic clusters and autosets of blood in acute lymphoblastic leukemia. *Gematologia i transfuziologia = Hematology and Transfusiology, 1999, vol. 44, no. 5, pp. 18–21. (In Russ.)*]
3. Виноградова Ю.У., Цветаева Н.В., Леках И.В. Свободно циркулирующие и скрытые аутоантитела в сыворотке больных аутоиммунными цитопениями // Иммунология. 2008. Т. 29, № 3. С. 163–166. [Vinogradova Yu.U., Tsvetaeva N.V., Lekakh I.V. Freely circulating and hidden autoantibodies in the serum of patients with autoimmune cytopenia. *Immunologiya = Immunologiya, 2008, vol. 29, no. 3, pp. 163–166. (In Russ.)*]
4. Гущин И.С. Иммуноглобулин Е — мишень противоаллергического действия // Российский аллергологический журнал. 2004. № 1. С. 5–9. [Gushchin I.S. Immunoglobulin E — target of antiallergic action. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Allergy, 2004, no. 1, pp. 5–9. (In Russ.)*]
5. Добродеева Л.К. Содержание иммуноглобулина Е в сыворотке крови людей, проживающих на Европейской территории России // Экология человека. 2010. № 5. С. 3–10. [Dobrodeeva L.K. Content of immunoglobulin E in the blood serum of people living on the European territory of Russia. *Ekologiya cheloveka = Human Ecology, 2010, no. 5, pp. 3–10. (In Russ.)*]
6. Кокряков В.Н., Ашмарин И.П., Пигаревский В.Е. О природе некоторых фагоцит-лизосомальных катионных белков лейкоцитов // Биохимия. 1973. № 6: 1280. [Kokryakov V.N., Ashmarin I.P., Pigarevsky V.E. The nature of some fractions of leukocytic lysosomal cationic proteins. *Biokhimiya = Biochemistry, 1973, no. 6: 1280. (In Russ.)*]
7. Лю Б.Н. Пероксигеназные процессы и лейкогенез // Успехи современной биологии. 2003. Т. 123, № 2. С. 147–160. [Liu B.N. Peroxygenation processes and leucogenes. *Uspekhi sovremennoi biologii = Biology Bulletin Reviews, 2003, vol. 123, no. 2, pp. 147–160. (In Russ.)*]
8. Патент № 2582936 Российская Федерация, МПК G01N 33/48 (2006.01), G01N 33/53 (2006.01) Способ выявления риска формирования гиперчувствительности немедленного типа: № 2014111635/15; заявлено 2014.03.26: опубликовано 2016.04.06 / Самодова А.В., Ставинская О.А., Добродеева Л.К., Карякина О.Е. Патентообладатель: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии природных адаптаций Уральского отделения Российской академии наук. 6 с. [Patent no. 2582936 Russian Federation, Int. Cl. G01N 33/48 (2006.01), G01N 33/53 (2006.01) Method for detecting the risk of immediate hypersensitivity formation. no. 2014111635/15; application: 2014.03.26: date of publication 2016.04.06 / Samodova A.V., Stavinskaya O.A., Dobrodeeva L.K., Karyakina O.E. Proprietors: Federal'noe gosudarstvennoe byudzhetnoe uchrezhdenie nauki Institut fiziologii prirodnyh adaptacij Ural'skogo otdeleniya Rossijskoj akademii nauk (FGBUN IFPA Uro RAN). 6 p.]
9. Петреня Н.Н., Добродеева Л.К., Мозер А.А. Уровни общих IgE у северян и их значение в физиологическом иммунном ответе // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2006. Т. 1, № 3 (14). С. 186–188. [Petrenya N.N., Dobrodeeva L.K., Moser A.A. Levels of common IgE in northerners and their significance in the physiological immune response. *Vestnik Ural'skoi Meditsinskoi Akademicheskoi Nauki = Journal of Ural Medical Academic Science, 2006, vol. 1, no. 3 (14), pp. 186–188. (In Russ.).*]
10. Самодова А.В., Добродеева Л.К. Роль шеддинга в активности иммунокомпетентных клеток с реагиновым механизмом защиты // Физиология человека. 2012. Т. 38, № 4. С. 114–120. [Samodova A.V., Dobrodeeva L.K. The role of shedding in the activity of immunocompetent cells with a reagin defense mechanism. *Fiziologiya cheloveka = Human Physiology, 2012, vol. 38, no. 4, pp. 114–120. (In Russ.)*]

11. Штаборов В.А., Леванюк А.И. Взаимодействие общих и местных реакций у лиц, родившихся и проживающих на Севере // Экология человека. 2010. № 10. С. 42–46. [Shtaborov V.A., Levanyuk A.I. Interaction of general and local reactions in people born and living in the North. *Ekologiya cheloveka = Human Ecology, 2010, no. 10, pp. 42–46. (In Russ.)*]
12. Capron M., Rouseaux J., Mazingue C. Rat mast cell-eosinophil interaction in antibody-dependent eosinophil citotoxicity to schistosoma mansoni schistosomula. *J. Immunol., 1978, vol. 121, no. 6, pp. 2518–2525.*
13. Frediani B.D., Vieira B.H., Joel F. B-1 cells temper endotoxemic inflammatory responses. *Immunobiology, 2011, vol. 216, no. 3, pp. 302–308. doi: 10.1016/j.imbio.2010.08.002*
14. Hill H.R., Qoie P.G. Raised serum-IgE levels and defective neutrophil chemotaxis in three children with eczema and recurrent bacterial infections. *Lancet, 1974, vol. 9, no. 1, pp. 183–187. doi: 10.1016/s0140-6736(74)92493-3*
15. Jandl J.H., Tomlinson A.S. The destruction of red cells by antibodies in man. II. Pyrogenic, leucocytic and therminal responses to immune hemolysis. *J. Clin. Invest., 1958, vol. 37, no. 7, pp. 1202–1220. doi: 10.1172/jci103710*
16. Kaufmann H.S., Hobbs J.R. Immunologic defects in an atopic population. *Lancet, 1970, no. 2, pp. 1061–1076.*
17. Theofilopoulus A.N., Dixon F.J. Immune complexes in human diseases: a review. *Am. J. Phathol., 1980, vol. 100, no. 2, pp. 531–591.*

Авторы:
Добродеева Л.К., д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки, главный научный сотрудник лаборатории регуляторных механизмов иммунитета, директор Института физиологии природных адаптаций ФГБУН Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики им. академика Н.П. Лаверова Уральского отделения РАН, г. Архангельск, Россия;
Самодова А.В., к.б.н., ведущий научный сотрудник, зав. лабораторией регуляторных механизмов иммунитета Института физиологии природных адаптаций ФГБУН Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики им. академика Н.П. Лаверова Уральского отделения РАН, г. Архангельск, Россия.

Authors:
Dobrodeeva L.K., PhD, MD (Medicine), Professor, Honored Worker of Science, Head Researcher, Laboratory of Immunity Regulatory Mechanisms, Director of the Institute of Natural Adaptations Physiology, N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Arkhangelsk, Russian Federation;
Samodova A.V., PhD (Biology), Leading Researcher, Head of the Laboratory of Immunity Regulatory Mechanisms, Institute of Natural Adaptations Physiology, N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Arkhangelsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 10.02.2021
Принята к печати 03.01.2022

Received 10.02.2021
Accepted 03.01.2022

Инфекция и иммунитет
2022, Т. 12, № 2, с. 306–314

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2022, vol. 12, no. 2, pp. 306–314

АНАЛИЗ СОСТОЯНИЯ ИММУНИТЕТА У ИНФИЦИРОВАННЫХ *HELICOBACTER PYLORI* БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГАСТРИТОМ

Е.В. Мохонова, В.А. Лапин, Д.А. Мелентьев, Д.В. Новиков, Н.В. Неумоина, К.М. Перфилова, М.В. Неумоина, Т.А. Трошина, И.В. Шутова, В.В. Новиков

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

Резюме. *Helicobacter pylori* считается этиологическим агентом хронического гастрита и ряда других заболеваний желудочно-кишечного тракта. Иммунный ответ на *H. pylori* характеризуется развитием как провоспалительных, так и толерогенных реакций. На этом фоне предполагается также возможность формирования аутоиммунных сдвигов. Цель настоящей работы — проведение сравнительного анализа состояния иммунитета у больных хроническим гастритом в стадии обострения, ассоциированным и не ассоциированным с инфицированием *H. pylori*. В работе использовали образцы цельной периферической крови (n = 50) и плазмы крови (n = 49) больных с впервые выявленным хроническим гастритом в стадии обострения, у которых с помощью ПЦР в реальном времени в желудочном соке тестировалось наличие или отсутствие ДНК *H. pylori*. В периферической крови больных с помощью проточной цитофлуориметрии и моноклональных антител оценивали относительное содержание $CD4^+FoxP3^+$ клеток (Т-регуляторы) и $CD4^+CD161^+$ клеток (IL-17 продуцирующие клетки), с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени определяли уровень мРНК FoxP3 и мРНК IL-17A, с применением иммуноферментного анализа определяли концентрацию IL-2 и IL-23. Показано, что у инфицированных *H. pylori* больных хроническим гастритом в стадии обострения, по сравнению с больными, не инфицированными *H. pylori*, в крови не изменяется содержание $CD4^+FoxP3^+$ клеток, $CD4^+CD161^+$ клеток, а также уровень мРНК FoxP3 и мРНК IL-17A. Поскольку равновесие между популяциями Th17-клеток и Т-регуляторов модулируется IL-2, который важен для генерации популяции Т-регуляторов, но ингибирует поляризацию иммунного ответа в сторону Th17-клеток, мы провели сравнительную оценку содержания IL-2 в крови больных хроническим гастритом. У всех больных выявлено повышение содержания IL-2 в сравнении с нормой. При этом концентрация IL-2 в крови инфицированных *H. pylori* больных была статистически значимо выше, чем у больных, не инфицированных *H. pylori*. Важным регулятором функции Th17-клеток является также IL-23, индуцирующий дифференцировку наивных Т-лимфоцитов в Th17-клетки, принимающие участие в воспалительных и аутоиммунных реакциях. В связи с этим мы провели определение уровня данного цитокина в крови больных хроническим гастритом. Выявлено многократное повышение концентрации IL-23 в сравнении с нормальным уровнем и более высокое содержание IL-23 у инфицированных *H. pylori* больных в сравнении с неинфицированными больными. На основании полученных данных можно заключить, что повышение концентрации IL-23 не исключает возможности формирования аутоиммунных сдвигов с его участием у лиц с хеликобактерной инфекцией, однако этот вопрос требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori, хронический гастрит, лимфоциты, проточная цитофлуориметрия, ОТ-ПЦР, мРНК.*

Адрес для переписки:
Мохонова Екатерина Валерьевна
603950, Россия, Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71,
ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии
им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора.
Тел.: 8 987 740-99-18. E-mail: ekaterinamohonova@yandex.ru

Contacts:
Ekaterina V. Mokhonova
603950, Russian Federation, Nizhniy Novgorod,
Malaya Yamskaya str., 71, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod
Scientific and Research Institute of Epidemiology and Microbiology
of the Rospotrebnadzor.
Phone: +7 987 740-99-18. E-mail: ekaterinamohonova@yandex.ru

Для цитирования:
Мохонова Е.В., Лапин В.А., Мелентьев Д.А., Новиков Д.В., Неумоина Н.В., Перфилова К.М., Неумоина М.В., Трошина Т.А., Шутова И.В., Новиков В.В. Анализ состояния иммунитета у инфицированных Helicobacter pylori больных хроническим гастритом // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 2. С. 306–314. doi: 10.15789/2220-7619-AOT-1725

Citation:
Mokhonova E.V., Lapin V.A., Melentiev D.A., Novikov D.V., Neumoina N.V., Perfilova K.M., Neumoina M.V., Troshina T.A., Shutova I.V., Novikov V.V. Analysis of the state of immunity in patients with chronic gastritis infected with Helicobacter pylori // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 2, pp. 306–314. doi: 10.15789/2220-7619-AOT-1725

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-AOT-1725

ANALYSIS OF THE STATE OF IMMUNITY IN PATIENTS WITH CHRONIC GASTRITIS INFECTED WITH *HELICOBACTER PYLORI*

Mokhonova E.V., Lapin V.A., Melentiev D.A., Novikov D.V., Neumoina N.V., Perfilova K.M., Neumoina M.V., Troshina T.A., Shutova I.V., Novikov V.V.

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

Abstract. *Helicobacter pylori* is considered an etiological agent of chronic gastritis and a number of other diseases of the gastrointestinal tract. The immune response to *H. pylori* is characterized by the development of both pro-inflammatory and tolerogenic reactions. Against this background, the possibility of forming autoimmune shifts is also assumed. The purpose of the present study was to conduct a comparative analysis of the state of immunity in patients with chronic gastritis in the exacerbation stage associated with and not associated with *H. pylori* infection. There were used whole peripheral blood (n = 50) and serum (n = 49) samples from 162 patients with primary chronic gastritis at the exacerbation stage, in which the presence or absence of *H. pylori* DNA was tested by real-time PCR in gastric juice. In the peripheral blood of patients, the relative content of $CD4^+FoxP3^+$ cells (T regulators) and $CD4^+CD161^+$ cells (IL-17 producing cells) was evaluated using flow cytofluorometry and monoclonal antibodies method, the level of mRNA FoxP3 and mRNA IL-17A was determined using real time RT-PCR, and the concentration of IL-2 and IL-23 was determined using enzyme immunoassay. It has been shown that in *H. pylori*-infected patients with chronic gastritis in the exacerbation stage in comparison with patients not infected with *H. pylori*, the content of $CD4^+FoxP3^+$ cells, $CD4^+CD161^+$ cells does not change in the blood, also with the level of mRNA FoxP3 and mRNA IL-17A. Since the equilibrium between the populations of Th17 cells and T regulators is modulated by IL-2, which is important for generating the population of T regulators, but inhibits polarization of the immune response towards Th17 cells, we conducted a comparative assessment of the serum IL-2 level in patients with chronic gastritis. All patients showed an increase in IL-2 content in comparison with the norm. In this case, the concentration of IL-2 in the blood of infected *H. pylori* patients was statistically significantly higher than in *H. pylori*-uninfected patients. An important regulator of the function of Th17 cells is also IL-23, which induces the differentiation of naive T lymphocytes into Th17 cells involved in inflammatory and autoimmune reactions. In this regard, we determined the level of this cytokine in the blood of patients with chronic gastritis. Multiple increase of IL-23 concentration in comparison with normal level and higher content of IL-23 in *H. pylori*-infected patients in comparison with uninfected patients were revealed. On the basis of the obtained data, it can be concluded that an increase in the concentration of IL-23 does not exclude the possibility of forming autoimmune shifts with its participation in persons with helicobacter infection, but the issue requires further study.

Key words: *Helicobacter pylori, chronic gastritis, lymphocytes, flow cytofluorimetry, RT-PCR, mRNA.*

Введение

В настоящее время показана связь между инфицированием организма агентами бактериальной и вирусной природы и развитием аутоиммунных заболеваний разного характера. Стало очевидным, что эволюционные процессы могут стимулировать фиксацию генетических вариаций, которые увеличивают или уменьшают степень иммунологической защиты организма от инфекций, но также приводят к более высокому риску развития аутоиммунных заболеваний [11]. В группу инфекционных агентов, которые могут служить потенциальными факторами развития аутоиммунных заболеваний, включен *Helicobacter pylori (H. pylori)*. Данный микроорганизм находится в центре пристального внимания с момента своего открытия в 1982 г. Он встречается у более чем 60% населения планеты. В настоящее время его считают основным этиологическим фактором гастрита и язвенной болезни, а также фактором, вовлеченным в генез рака и лимфомы желудка MALT-типа [12, 19]. Характерной особенностью хеликобактерной инфекции является то, что у значительного процента зараженных она протекает практически бессимптомно, что, несомненно, сильно затрудняет ее идентификацию [9]. Одним из факторов, влияющих на подобное положение вещей, считают способность *H. pylori* воздействовать на иммунный ответ хозяина, направляя его в сторону усиления толерогенных процессов [5]. На фоне толерогенного действия показана возможность влиять на развитие аутоиммунных и аллергических заболеваний [8, 17, 21, 31]. Таким образом существует достаточно сложная и неоднозначная картина влияния *H. pylori* на иммунологические процессы организма, в том числе на состояние иммунитета и цитокинового статуса у больных хроническим гастритом. Цель настоящей работы — проведение сравнительного анализа состояния иммунитета у больных с хроническим гастритом в стадии обострения, ассоциированным и не ассоциированным с инфицированием *H. pylori*.

Материалы и методы

Исследование проводили согласно биоэтическим и этическим принципам, установленным Хельсинкской декларацией, принятой в июне 1964 г. (г. Хельсинки, Финляндия) и пересмотренной в октябре 2013 г. (г. Форталеза, Бразилия). В соответствии со статьей 24 Конституции РФ и Хельсинкской декларацией (1964 г.) все пациенты дали информированное согласие на использование биологического материала в научном исследовании. Проведение данного исследования одобрено локальным комитетом по этике ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора (протокол № 6 от 25.11.2021). В работе использовали образцы цельной периферической крови (n = 50) и плазмы крови (n = 49) больных с впервые выявленным хроническим гастритом в стадии обострения, проходивших лечение в клинике инфекционных болезней ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора. Диагноз «хронический гастрит» подтверждали проводимым алгоритмом исследования с детализацией жалоб и времени их появления, проведением эзофагогастродуоденоскопии (ЭГДС) с забором биопсии слизистой оболочки из антрального отдела и тела желудка, морфологическим исследованием биоптатов слизистой. При выполнении исследования в серии предварительных наблюдений было проведено сопоставление результатов ПЦР (определение ДНК *H. pylori* в желудочном соке) с анализом обсемененности образцов биопсии слизистой антрального отдела и тела желудка *H. pylori*, а также сопоставление результатов ПЦР с выделением *H. pylori* в культуру и анализом образцов с помощью MALDI-TOF спектрометрии с использованием аппарата Autoflex Speed LRF (Bruker Daltonics, Германия). Во всех случаях было обнаружено полное совпадение результатов ПЦР, анализа биопсии и результатов спектрометрии. В связи с этим в дальнейшей работе мы использовали только определение ДНК *H. pylori* в желудочном соке методом ПЦР в реальном времени с использованием набора «РеалБест ДНК *Helicobacter pylori*» производства «Вектор-Бест», Россия.

В первую группу вошли лица с гастритами (n = 26), ассоциированными с *H. pylori*, а во вторую — с гастритами, не связанными с инфекцией *H. pylori* (n = 24).

Периферическую кровь забирали в объеме 10 мл в вакуумные пробирки с динатриевой солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) (Vacuette, Германия) и использовали в дальнейшем исследовании.

Из образцов цельной периферической крови выделяли лейкоцитарную фракцию клеток. В отдельной пробирке смешивали 1 мл крови и 10 мл раствора для лизиса эритроцитов (1x Red Blood Cell (1x RBC) Lysis Buffer, eBioscience, США), аккуратно перемешивали и инкубировали 10 минут при комнатной температуре. Лейкоциты осаждали центрифугированием 5 минут (400g, 2–8°C) и промывали 0,9% NaCl. Лейкоциты ресуспендировали в 400 мкл буфера для цитометрии (Flow Cytometry Staining Buffer Solution, eBioscience, США). Для фенотипирования Th17 проводили поверхностное окрашивание моноклональными антителами Anti-Human CD4-FITC, Anti-Human CD161-PE (eBioscience, США). Для фенотипирования Т-регуляторных лимфоцитов клетки окрашивали моноклональными антителами Anti-Human CD4-FITC (eBioscience, США), фиксировали и пермеабилизировали соответствующим набором буферных растворов (Fixation/Permeabilization Diluent, Permeabilization Buffer 10X, eBioscience, США) и добавляли моноклональные антитела Anti-Human FoxP3-PE (eBioscience, США). Клетки анализировали на проточном цитофлуориметре CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Использовали программное обеспечение CytExpert (Beckman Coulter, США). Т-хелперы 17 типа (Th17) и Т-регуляторы (Treg) определяли как клетки фенотипа $CD4^+CD161^+$ и клетки фенотипа $CD4^+FoxP3^+$ соответственно [10, 11].

Содержание цитокинов IL-2 и IL-23 определяли в плазме крови с помощью иммуноферментных наборов Интерлейкин-2-ИФА-БЕСТ (Вектор-Бест, Россия) и Human IL-23 Platinum ELISA (eBioscience, США). При анализе результатов в качестве нормы использовали данные производителей наборов и результаты, представленные в работах других авторов. За норму принимали концентрацию IL-2 не выше 10 пг/мл [2], концентрацию IL-23 не выше 40 пг/мл [30].

Относительный уровень мРНК IL-17A и FoxP3 определяли в периферической крови методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Для этого из 200 мкл периферической крови выделяли нуклеиновую кислоту с использованием набора «РИБО-преп» (Интерлабсервис, Россия) и инкубировали с DNase I RNase-free (Fermentas, ЕС) для удаления ДНК, согласно рекомендациям производителей. Полученный препарат РНК использовали в реакции обратной транскрипции с использованием статистических затравок и M-MLV RT (Invitogen, США). С полученной комплементарной ДНК проводили дуплексную полимеразную цепную реакцию в реальном времени. Реакционная смесь содержала 20 mMTris-HClpH 8.4, 50 mMKCl, 1,5 мМ $MgCl_2$, 0,4 мМдНТФ, по 10 пг прямого, обратного праймеров и флуоресцентно меченных зондов, 5 единиц активности полимеразы TaqF (Амплисенс, Россия) и 2 мкл комплементарной ДНК. Реакцию проводили в амплификаторе

Таблица. Первичная структура олигонуклеотидов
Table. Primary structure of oligonucleotides

мРНК mRNA	**Праймер** Primer	**Первичная структура (5′→3′)** Primary structure (5′→3′)
IL-17	**прямой**/forward	TCTGTGATCTGGGAGGCAAAGT
	обратный/reverse	GGAGTTGGGGCAGTGTGGAG
	зонд/probe	ROX-TGGGAACGTGGACTACCACATGAACTCT-BHQ-2
FoxP3	**прямой**/forward	GAGAAGCTGAGTGCCATGCA
	обратный/reverse	GGAGCCCTTGTCGGATGAT
	зонд/probe	FAM-TGCCATTTTCCCAGCCAGGTGG-BHQ-1
YWHAZ	**прямой**/forward	TGCAATGATGTACTGTCTCT
	обратный/reverse	ACTGATCGACAATCCCTTTC
	зонд/probe	Cy5-ATTACTACCGTTACTTGGCTGAGGTTGCC-BHQ-2

DTprime5 (ООО «ДНК-Технология, Россия) при следующих температурных условиях: 94°C — 10 мин, 45 циклов амплификации (94°C — 30 с, 55°C — 30 с, 72°C — 30 с). Первичная структура используемых праймеров и зондов представлена в табл.

Уровень исследуемой мРНК (X) рассчитывали относительно мРНК референсного гена (N) с использованием значений пороговых циклов амплификации Ct по формуле: $2^{-(CtN-CtX)}$.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерной программы GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). Исследованные количественные показатели представлены в виде Me (25–75%), где Me — медиана, 25% — нижний квартиль, 75% — верхний квартиль. Для сопоставления двух независимых групп использовали двусторонний U-критерий Манна–Уитни, предварительно проведя проверку на нормальное распределение значений. Корреляционный анализ проводили методом ранговой корреляции Спирмена. Различия между группами полагали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты

В крови больных хроническим гастритом проанализировано содержание клеток фенотипа CD4⁺FoxP3⁺ от всех CD4⁺ Т-лимфоцитов. Обнаружено, что у пациентов, положительных по *H. pylori*, медиана содержания клеток фенотипа CD4⁺FoxP3⁺ составила 2,37 (1,52–4,45)%. В то же время у пациентов с отсутствием хе-

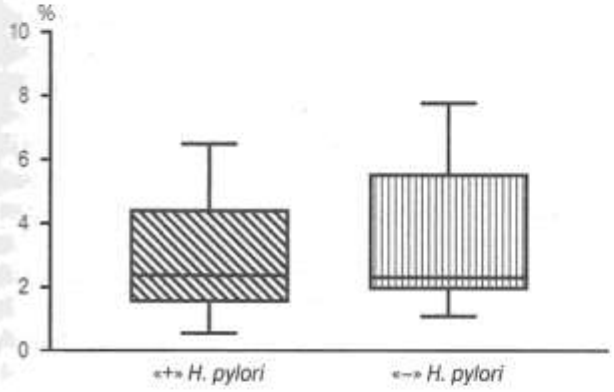

Рисунок 1. Содержание клеток CD4⁺FoxP3⁺ в периферической крови больных хроническим гастритом, инфицированных (+) и не инфицированных (–) *H. pylori* (% от CD4⁺ Т-лимфоцитов)

Figure 1. The content of CD4⁺FoxP3⁺ cells in the peripheral blood of patients with chronic gastritis infected (+) and not infected (–) with *H. pylori* (% от CD4⁺ T cells)

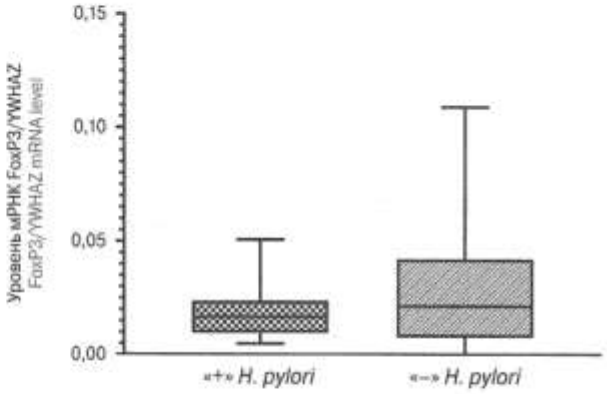

Рисунок 2. Уровень мРНК FoxP3 относительно мРНК YWHAZ в периферической крови больных хроническим гастритом, инфицированных (+) и не инфицированных (–) *H. pylori*

Figure 2. The level of FoxP3 mRNA relative to YWHAZ mRNA in the peripheral blood of patients with chronic gastritis infected (+) and not infected (–) with *H. pylori*

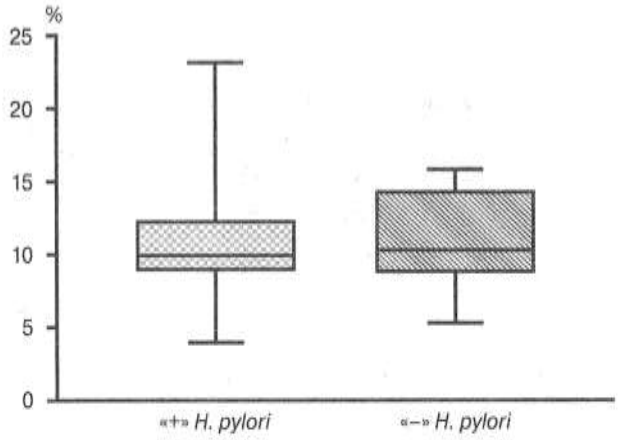

Рисунок 3. Содержание клеток CD4⁺CD161⁺ в периферической крови больных хроническим гастритом, инфицированных (+) и не инфицированных (–) *H. pylori* (% от CD4⁺ Т-лимфоцитов)

Figure 3. The content of CD4⁺CD161⁺ cells in the peripheral blood of patients with chronic gastritis infected (+) and not infected (–) with *H. pylori* (% от CD4⁺ T cells)

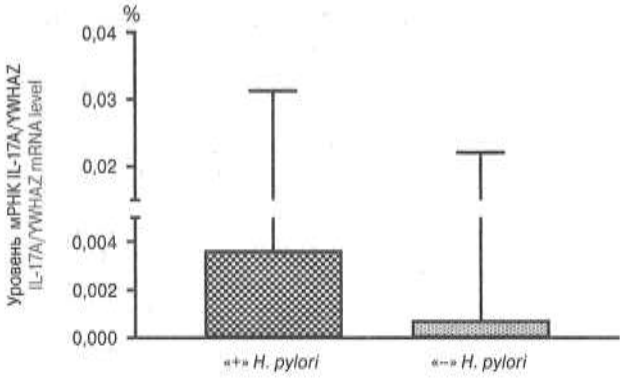

Рисунок 4. Уровень мРНК IL-17A относительно мРНК YWHAZ в периферической крови больных хроническим гастритом, инфицированных (+) и не инфицированных (–) *H. pylori*

Figure 4. The level of IL-17A mRNA relative to YWHAZ mRNA in the peripheral blood of patients with chronic gastritis infected (+) and not infected (–) with *H. pylori*

ликобактерной инфекции этот показатель составил 2,31 (1,92–5,58)% (рис. 1). Количество клеток фенотипа CD4⁺FoxP3⁺ у пациентов с наличием *H. pylori* статистически значимо не отличалось от такового у пациентов, у которых *H. pylori* не было выявлено.

С помощью ОТ-ПЦР в реальном времени был определен относительный уровень мРНК гена, кодирующего FoxP3. Статистически значимых различий в экспрессии гена FoxP3 у больных, инфицированных и не инфицированных *H. pylori*, обнаружено не было, что соответствует результатам цитофлуориметрического анализа (рис. 2).

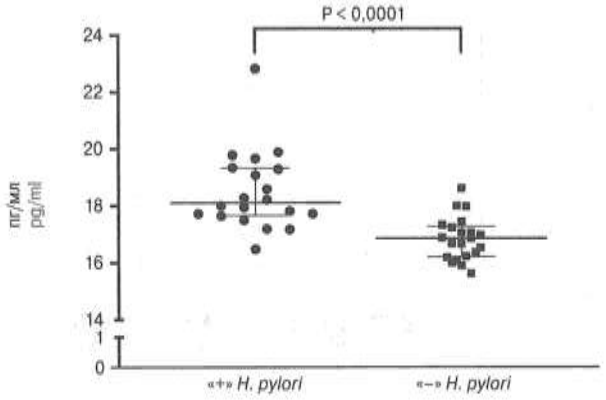

Рисунок 5. Содержание IL-2 в сыворотке крови больных хроническим гастритом, инфицированных (+) и не инфицированных (–) *H. pylori*

Figure 5. The content of IL-2 in the blood serum of patients with chronic gastritis infected (+) and not infected (–) with *H. pylori*

Примечание. p ≤ 0,001 достоверные отличия при p ≤ 0,05.
Note. p ≤ 0.001 significant differences at p ≤ 0.05.

Цитофлуориметрический анализ популяций CD4⁺ клеток показал, что относительное содержание Т-лимфоцитов фенотипа CD4⁺CD161⁺ у положительных по *H. pylori* пациентов с обострением хронического гастрита статистически значимо не отличалось от количества CD4⁺CD161⁺ клеток у больных хроническим гастритом в стадии обострения, но не инфицированных *H. pylori*. Медиана содержания Т-лимфоцитов фенотипа CD4⁺CD161⁺ у пациентов с положительным тестом на *H. pylori* составила 9.94 (8,89–12,36)% от всех CD4⁺ клеток, у пациентов, негативных по *H. pylori*, — 10,84 (8,74–14,40)% от всех CD4⁺ клеток (рис. 3).

Наряду с цитофлуориметрическим анализом содержания CD4⁺CD161⁺ клеток в крови больных хроническим гастритом был определен относительный уровень мРНК IL-17A (рис. 4). В крови больных, инфицированных *H. pylori*, как и в крови больных, отрицательных по этому показателю, содержание мРНК IL-17A статистически значимо не различалось, что соответствует полученным данным по содержанию CD4⁺CD161⁺ клеток.

В сыворотке крови больных хроническим гастритом в стадии обострения был определен уровень цитокинов IL-2 и IL-23. Медиана концентрации IL-2 у пациентов, положительных по *H. pylori*, составила 18,51 (17,67–19,34) пг/мл, у отрицательных — 16,84 (16,21–17,28) пг/мл (рис. 5). В сыворотке крови пациентов, инфицированных *H. pylori*, выявлено статистически

значимое повышение уровня IL-2 в сравнении с группой пациентов, не инфицированных *H. pylori* (p < 0,0001).

У отрицательных по *H. pylori* пациентов медиана концентрации IL-23 составила 294,8 [259,1–362,9] пг/мл. В то же время у положительных по *H. pylori* пациентов она была статистически значимо выше и составила 419,8 [324,2–625,4] пг/мл (p = 0,0008) (рис. 6). В обоих случаях уровень IL-23 многократно превышал показатели нормы.

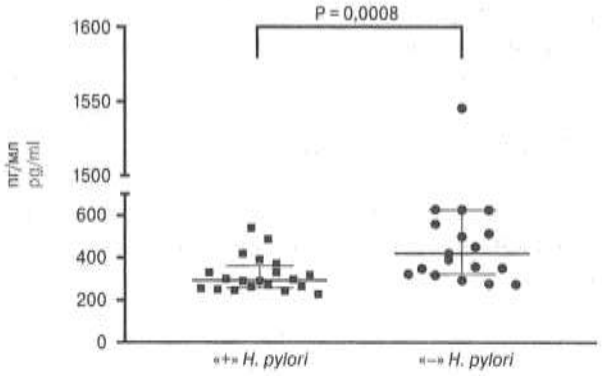

Рисунок 6. Содержание IL-23 в сыворотке крови больных хроническим гастритом, инфицированных (+) и не инфицированных (–) *H. pylori*

Figure 6. The content of IL-23 in the blood serum of patients with chronic gastritis infected (+) and not infected (–) with *H. pylori*

Примечание. p = 0,008 достоверные отличия при p ≤ 0,05.
Note. p = 0.008 significant differences at p ≤ 0.05.

Обсуждение

В настоящее время хорошо известно, что Т-клетки, продуцирующие IL-17 и IFNγ, играют решающую роль в иммунитете против *H. pylori*, а регуляторные Т-клетки способны подавлять эти Т-клеточные функции и обладают толерогенным действием [16]. У инфицированных *H. pylori* пациентов в слизистой желудка обнаружено повышенное содержание Т-регуляторов, которое положительно коррелирует с тяжестью хронического гастрита [15]. Ранее нами была проведена оценка способности *H. pylori* модулировать дифференцирующее действие на Т-лимфоциты при прямом контакте в условиях *in vitro*, что оценивалось по изменению содержания в культуре Т-регуляторов фенотипа $CD4^+CD25^+FoxP3^+$. Было показано, что при прямом контакте с *H. pylori* количество Т-регуляторов увеличивается в 2,5 раза. Одновременно регистрировалось многократное повышение продукции Т-клетками IL-10 [1].

Представлены сообщения о локальных изменениях количества Т-регуляторов в слизистой оболочке желудка и об увеличении их количества в периферической крови больных с инфекцией $CagA^+$ *H. pylori*, которое определялось по уровню $CD4^+CD25^{+hi}$ клеток. Однако, в крови больных с $CagA^-$ *H. pylori* инфекцией уровень $CD4^+CD25^{+hi}$ клеток оставался соответствующим норме [29]. В исследовании K. Hussain и соавт. показано, что содержание $FoxP3^+$ клеток среди $CD4^+CD25^{+hi}$ клеток периферической крови и уровень мРНК FoxP3 не различались у инфицированных и неинфицированных *H. pylori* доноров [14], что соответствует полученным нами данным об отсутствии различий между инфицированными и не инфицированными *H. pylori* больными хроническим гастритом, содержании в периферической крови $CD4^+FoxP3^+$ Т-клеток и мРНК FoxP3.

Наряду с оценкой влияния *H. pylori* на популяцию Т-регуляторов в условиях *in vitro* ранее нами была проведена также оценка влияния *H. pylori* на популяции $CD4^+CD161^+$ Т-клеток, которые являются IL-17-продуцирующими клетками и перекрываются с популяцией Th17-клеток, играющей важную роль в развитии иммунного ответа на *H. pylori*. Было показано, что при прямом контакте с *H. pylori* содержание $CD4^+CD161^+$ Т-лимфоцитов не изменяется на фоне многократного повышения концентрации INFγ [3]. В то же время имеются сообщения о повышении уровня Th17-клеток, продуцирующих IL-17 в слизистой желудка инфицированных *H. pylori* лиц [10].

По данным литературы, количество Th17-клеток в крови здоровых доноров составляет 6–7% от всех $CD4^+$ клеток [20, 27]. Содержание Т-клеток фенотипа $CD4^+CD161^+$ у тестированных больных обеих групп превышало представленные в литературе контрольные показатели $CD4^+CD161^+$ клеток в крови здоровых доноров.

Молекула CD161, известная как молекула, относящаяся к лектиноподобным рецепторам натуральных киллеров, участвует в клеточной передаче сигналов и активации клеток. Имеются противоречивые данные о специфичности этой молекулы по отношению к Th17-клеткам, поскольку она экспрессируется в различной степени на многих других популяциях Т-клеток, включая наивные Т-клетки, $CD4^+$ Т-клетки памяти, Th2 и Т-регуляторные клетки [4, 22, 25].

Определение мРНК IL-17A, продукция которого характерна для Th17-клеток, также не обнаружило различий между инфицированными *H. pylori* и не инфицированными *H. pylori* больными. Известно несколько изоформ IL-17, самыми распространенными из которых являются IL-17A и IL-17C. В слизистой желудка больных с хеликобактерной инфекцией недавно был обнаружен повышенный уровень мРНК IL-17C,

уровень IL-17A не менялся в ответ на инфицирование *H. pylori* [28]. Однако существуют и противоположные данные, свидетельствующие о повышении и понижении экспрессии мРНК IL-17 в слизистой разных отделов желудка при хеликобактерной инфекции [24]. Данных о содержании IL-17A в крови при хеликобактерной инфекции в доступной литературе нами не обнаружено.

Таким образом, полученные в рамках настоящей работы результаты свидетельствуют об отсутствии на системном уровне изменений в содержании регуляторных $CD4^+FoxP3^+$ клеток, мРНК FoxP3, мРНК IL-17A и близкой к Th17 популяции $CD4^+CD161^+$ Т-клеток у инфицированных *H. pylori* больных хроническим гастритом.

Известно, что равновесие между популяциями Th17-клеток и Treg модулируется IL-2, который важен для генерации популяции Т-регуляторов, но ингибирует поляризацию иммунного ответа в сторону Th17-клеток. Делеции в гене, кодирующем IL-2, блокада антителами против IL-2, разрушение сигнальных путей транскрипционного фактора STAT5 приводит к дифференцировке в сторону популяции Th17-клеток [18]. Мы оценили уровень IL-2 в крови больных хроническим гастритом в стадии обострения. Обнаружено повышение сывороточного содержания IL-2 в крови, инфицированных *H. pylori* лиц, что, вероятно, является свидетельством смещения равновесия популяций Т-клеток в сторону Treg и объясняет не только отсутствие повышенного содержания у инфицированных *H. pylori* больных уровня $CD4^+CD161^+$ Т-клеток, но также отсутствие различий в содержании мРНК IL-17A.

Еще одним важным регулятором функции Th17-клеток является IL-23, основная роль которого — индукция дифференцировки наивных Т-лимфоцитов в Th1- и Th17-клетки, принимающие участие в воспалительных и аутоиммунных реакциях [26]. Интерлейкин-23 (IL-23) относится к семейству IL-12. Показано, что IL-23 повышает секрецию IL-17, в то время как IL-12 опосредует специфическое ингибирование продукции IL-17. Считается, что за счет этого IL-23 играет роль провоспалительного цитокина, стимулируя продукцию Т-лимфоцитами IL-17 [22]. IL-23 может выступать в качестве промотора аутоиммунного воспаления, в отличие от IL-12, который парадоксальным образом обеспечивает защиту от аутоиммунного воспаления [23]. Нами получены данные о многократном повышении уровня IL-23 в крови больных хроническим гастритом, что отражает наличие воспалительных процессов, сопровождающих течение острой фазы заболевания. Кроме того, получены данные о статистически значимом подъеме содержания IL-23 в крови инфицированных *H. pylori* больных в сравнении с больными, у которых *H. pylori* не был выявлен. Это указывает как на провоспалительное действие IL-23, развивающееся при обострении хронического гастрита, так и на возможную провокацию этим цитокином аутоиммунных реакций. Показано, что слизистыми поверхностями инфицированных *H. pylori* лиц продуцируется повышенное количество IL-23, которое поддерживает продукцию IL-17, результатом чего является стимуляция воспаления [6, 7]. Известно, что повышенное содержание IL-23 ассоциируется с некоторыми аутоиммунными заболеваниями, такими как ревматоидный артрит и множественный склероз [30]. Полученные нами результаты не исключают возможного участия IL-23 в формировании аутоиммунных сдвигов у лиц с хеликобактерной инфекцией, однако этот вопрос требует дальнейшего изучения.

Список литературы/References

1. Матвеичев А.В., Талаева М.В., Талаев В.Ю., Неумоина Н.В., Перфилова К.М., Лапаев Д.Г., Мохонова Е.В., Цыганова М.И., Коптелова В.Н., Никитина З.И., Лапин В.А., Мелентьев Д.А. Влияние Helicobacter pylori на дифференцировку Т-регуляторных клеток // Анализ риска здоровью. 2017. № 1. С. 21–28. [Matveichev A.V., Talaeva M.V., Talaev V.Yu., Neumoina N.V., Perfilova K.M., Lapaev D.G., Mokhonova E.V., Tsyganova M.I., Koptelova V.N., Nikitina Z.I., Lapin V.A., Melentiev D.A. Influence exerted by Helicobacter pylori on regulatory T-cells differentiation. *Analiz riska zdorovyu = Health Risk Analysis, 2017, no. 1, pp. 21–28. (In Russ.)*] *doi: 10.21668/health.risk/2017.1.03.eng*
2. Синяков А.А., Смирнова О.В., Каспаров Э.В. Показатели некоторых цитокинов у больных хроническим, хроническим атрофическим гастритом на фоне Helicobacter pylori-инфекции // Сибирский журнал естественных наук и сельского хозяйства. 2019. Т. 11, № 5–2. С. 124–128. [Sinyakov A.A., Smirnova O.V., Kasparov E.V. Indicators of some cytokines in patients with chronic, chronic atrophic gastritis with Helicobacter pylori infection. *Sibirskiy zhurnal estestvennykh nauk i sel'skogo khozyaystva = Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture, 2019, vol. 11, no. 5–2, pp. 124–128. (In Russ.)*] *doi: 10.12731/2658-6649-2019-11-5-2-124-128*
3. Цыганова М.И., Талаева М.В., Талаев В.Ю., Неумоина Н.В., Перфилова К.М., Мохонова Е.В., Лапин В.А., Мелентьев Д.А. Влияние Helicobacter pylori на содержание провоспалительных Т-клеточных цитокинов и продуцирующих их субпопуляций // Анализ риска здоровью. 2018. № 3. С. 120–127. [Tsyganova M.I., Talaeva M.V., Talaev V.Yu., Neumoina N.V., Perfilova K.M., Mokhonova E.V., Lapin V.A., Melentiev D.A. Influence exerted by Helicobacter pylori on concentrations of anti-inflammatory T-cell cytokines and sunpopulations that produce them. *Analiz riska zdorov'yu = Health Risk Analysis, 2018, no. 3, pp. 120–127. (In Russ.)*] *doi: 10.21668/health.risk/2018.3.13.eng*

4. Afzali B., Mitchell P.J., Edozie F.C., Povoleri G.A.M., Dowson S.E., Demandt L., Walter G., Canavan J.B., Scotta C., Menon B., Chana P.S., Khamri W., Kordasti S., Heck S., Grimbacher B., Tree T., Cope A.P., Taams L.S., Lechler R.I., John S., Lombardi G. CD161 expression characterizes a subpopulation of human regulatory T cells that produces IL-17 in a STAT3-dependent manner. *Eur. J. Immunol., 2013, vol. 43, no. 8, pp. 2043–2054. doi: 10.1002/eji.201243296*
5. Altobelli A., Bauer M., Velez K., Cover T.L., Müller A. Helicobacter pylori VacA targets myeloid cells in the gastric lamina propria to promote peripherally induced regulatory T-cell differentiation and persistent infection. *mBio, 2019, vol. 10, no. 2: e00261-19. doi: 10.1128/mBio.00261-19*
6. Caruso R., Fina D., Paoluzi O.A., Blanco G.D.V., Stolfi C., Rizzo A., Caprioli F., Sarra M., Andrei F., Fantini M.C., MacDonald T.T., Pallone F., Monteleone G. IL-23-mediated regulation of IL-17 production in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa. *Eur. J. Immunol., 2008, vol. 38, no. 2, pp. 470–478. doi: 10.1002/eji.200737635*
7. Caruso R., Pallone F., Monteleone G. Emerging role of IL-23/IL-17 axis in H. pylori-associated pathology. *World J. Gastroenterol., 2007, vol. 13, no. 42, pp. 5547–5551. doi: 10.3748/wjg.v13.i42.5547*
8. Chmiela M., Gonciarz W. Molecular mimicry in Helicobacter pylori infections. *World J. Gastroenterol., 2017, vol. 23, no. 22, pp. 3964–3977. doi: 10.3748/wjg.v23.i22.3964*
9. Chojnacki C., Popławski T., Błońska A., Błasiak J., Romanowski M., Chojnacki J. Expression of tryptophan hydroxylase in gastric mucosa in symptomatic and asymptomatic Helicobacter pylori infection. *Arch. Med. Sci., 2019, vol. 15, no. 2, pp. 416–423. doi: 10.5114/aoms.2018.76928*
10. Dixon B.R.E.A., Hossain R., Patel R.V., Algood H.M.C. Th17 Cells in Helicobacter pylori infection: a dichotomy of help and harm. *Infect. Immun., 2019, vol. 87, no 11: e00363-19. doi: 10.1128/IAI.00363-19*
11. Dominguez-Andres J., Netea M.G. Impact of historic migrations and evolutionary processes on human immunity. *Trends Immunol., 2019, vol. 40, no. 12, pp. 1105–1119. doi: 10.1016/j.it.2019.10.001*
12. FitzGerald R., Smith S.M. An overview of Helicobacter pylori infection. *Methods Mol. Biol., 2021, vol. 2283, pp 1–14. doi: 10.1007/978-1-0716-1302-3_1*
13. Hoeve M.A., Savage N.D.L., de Boer T., Langenberg D.M.L., de Waal Malefyt R., Ottenhoff T.H.M., Verreck F.A.W. Divergent effects of IL-12 and IL-23 on the production of IL-17 by human T cells. *Eur. J. Immunol., 2006, vol. 36, no. 3, pp. 661–670. doi: 10.1002/eji.200535239*
14. Hussain K., Letley D.P., Greenaway A.B., Kenefeck R., Winter J.A., Tomlinson W., Rhead J., Staples E., Kaneko K., Atherton J.C., Robinson K. Helicobacter pylori-mediated protection from allergy is associated with IL-10-secreting peripheral blood regulatory T cells. *Front. Immunol., 2016, vol. 7: 71. doi: 10.3389/fimmu.2016.00071*
15. Jang T.J. The number of Foxp3-positive regulatory T-cells is increased in Helicobacter pylori gastritis and gastric cancer. *Pathol. Res. Pract., 2010, vol. 206, no. 1, pp. 34–38. doi: 10.1016/j.prp.2009.07.019*
16. Kandulski A., Malfertheiner P., Wex T. Role of regulatory T-cells in H. pylori-induced gastritis and gastric cancer. *Anticancer Res., 2010, vol. 30, no. 4, pp. 1093–1103.*
17. Lankarani K.B., Honarvar B., Athari S.S. The mechanisms underlying Helicobacter pylori-mediated protection against allergic asthma. *Tanaffos, 2017, vol. 16, no. 4, pp. 251–259.*
18. Laurence A., Tato C. M., Davidson T.S., Kanno Y., Chen Z., Yao Z., Blank R.B., Meylan F., Siegel R., Hennighausen L., Shevach E.M., O'Shea J.J. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity, 2007, vol. 26, no. 3, pp. 371–381. doi: 10.1016/j.immuni.2007.02.009*
19. Leja M., Axon A., Brenner H. Epidemiology of Helicobacter pylori infection. *Helicobacter, 2016, vol. 21, no. 1, pp. 3–7. doi: 10.1111/hel.12332*
20. Li L., He J., Zhu L., Yang J.Y., Jia R., Liu X., Liu Y., Sun X., Li Z. The clinical relevance of IL-17-producing CD4+ CD161+ cell and its subpopulations in primary Sjögren's Syndrome. *J. Immunol. Res., 2015: 307453. doi: 10.1155/2015/307453*
21. Magen E., Delgado J.-S. Helicobacter pylori and skin autoimmune diseases. *World J. Gastroenterol., 2014, vol. 20, no. 6, pp. 1510–1516. doi: 10.3748/wjg.v20.i6.1510*
22. Maggi L., Santarlasci V., Capone M., Peired A., Frosali F., Crome S.Q., Querci V., Fambrini M., Liotta F., Levings M.K., Maggi E., Cosmi L., Romagnani S., Annunziato F. CD161 is a marker of all human IL-17-producing T-cell subsets and is induced by RORC. *Eur. J. Immunol., 2010, vol. 40, no. 8, pp. 2174–2181. doi: 10.1002/eji.200940257*
23. Murphy C.A., Langrish C.L., Chen Y., Blumenschein W., McClanahan T., Kastelein R.A., Sedgwick J.D., Cua D.J. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J. Exp. Med., 2003, vol. 198, no. 12, pp. 1951–1957. doi: 10.1084/jem.20030896*
24. Outlioua A., Badre W., Desterke C., Echarki Z., El Hammani N., Rabhi M., Riyad M., Karkouri M., Arnoult D., Khalil A., Akarid K. Gastric IL-1β, IL-8, and IL-17A expression in Moroccan patients infected with Helicobacter pylori may be a predictive signature of severe pathological stages. *Cytokine, 2020, vol. 126: 154893. doi: 10.1016/j.cyto.2019.154893*
25. Ramesh R., Kozhaya L., McKevitt K., Djuretic I.M., Carlson T.J., Quintero M.A., McCauley J.L., Abreu M.T., Unutmaz D., Sundrud M.S. Pro-inflammatory human Th17 cells selectively express P-glycoprotein and are refractory to glucocorticoids. *J. Exp. Med., 2014, vol. 211, no. 1, pp. 89–104. doi: 10.1084/jem.20130301*
26. Schinocca C., Rizzo C., Fasano S., Grasso G., Barbera L.L., Ciccia F., Guggino G. Role of the IL-23/IL-17 pathway in rheumatic diseases: an overview. *Front. Immunol., 2021, vol. 12: 637829. doi: 10.3389/fimmu.2021.637829*
27. Shen H., Goodall J.C., Gaston J.S.H. Frequency and phenotype of peripheral blood Th17 cells in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum., 2009, vol. 60, no. 6, pp. 1647–1656. doi: 10.1002/art.24568*
28. Tanaka S., Nagashima H., Cruz M., Uchida T., Uotani T., Abreu J.A.J., Mahachai V., Vilaichone R., Ratanachuek T., Tshering L., Graham D.Y., Graham D.Y., Yamaoka Y. Interleukin-17C in human Helicobacter pylori gastritis. *Infect. Immun., 2017, vol. 85, no. 10: e00389-17. doi: 10.1128/IAI.00389-17*
29. Wang S.K., Zhu H.F., He B.S., Zhang Z.Y., Chen Z.T., Wang Z.Z., Wu G.L. CagA+ H. pylori infection is associated with polarization of T helper cell immune responses in gastric carcinogenesis. *World J. Gastroenterol., 2007, vol. 13, no. 21, pp. 2923–2931. doi: 10.3748/wjg.v13.i21.2923*

30. Zaky D.S.E., El-Nahrery E.M.A. Role of interleukin-23 as a biomarker in rheumatoid arthritis patients and its correlation with disease activity. *Int. Immunopharmacol., 2016, vol. 31, pp. 105–108. doi: 10.1016/j.intimp.2015.12.011*
31. Zuo Z.T., Ma Y., Sun Y., Bai C.Q., Ling C.H., Yuan F.L. The protective effects of Helicobacter pylori infection on allergic asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol., 2021, vol. 182, no. 1, pp. 53–64. doi: 10.1159/000508330*

Авторы:
Мохонова Е.В., научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Лапин В.А., младший научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Мелентьев Д.А., младший научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Новиков Д.В., к.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Неумоина Н.В., к.м.н., главный врач клиники инфекционных болезней ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Перфилова К.М., к.м.н., заместитель главного врача клиники инфекционных болезней ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Неумоина М.В., к.м.н., зав. отделением консультации и приема больных клиники инфекционных болезней ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Трошина Т.А., зав. третьим инфекционным отделением клиники инфекционных болезней ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Шутова И.В., к.м.н., зав. вторым инфекционным отделением клиники инфекционных болезней ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Новиков В.В., д.б.н., профессор, зав. лабораторией иммунохимии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия.

Authors:
Mokhonova E.V., Researcher, Immune Chemistry Laboratory, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific and Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Rospotrebnadzor, Nizhniy Novgorod, Russian Federation;
Lapin V.A., Junior Researcher, Immune Chemistry Laboratory, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific and Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Rospotrebnadzor, Nizhniy Novgorod, Russian Federation;
Melentiev D.A., Junior Researcher, Immune Chemistry Laboratory, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific and Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Rospotrebnadzor, Nizhniy Novgorod, Russian Federation;
Novikov D.V., PhD (Biology), Associate Professor, Leading Researcher, Immune Chemistry Laboratory, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific and Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Rospotrebnadzor, Nizhniy Novgorod, Russian Federation;
Neumoina N.V., PhD (Medicine), Head Physician of the Infectious Diseases Clinic, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific and Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Rospotrebnadzor, Nizhniy Novgorod, Russian Federation;
Perfilova K.M., PhD (Medicine), Deputy Head Physician of the Infectious Diseases Clinic, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific and Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Rospotrebnadzor, Nizhniy Novgorod, Russian Federation;
Neumoina M.V., PhD (Medicine), Head of the Department of Patient Consultation and Admission, Infectious Diseases Clinic, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific and Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Rospotrebnadzor, Nizhniy Novgorod, Russian Federation;
Troshina T.A., Head of the Third Infection Diseases Department, Infectious Diseases Clinic, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific and Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Rospotrebnadzor, Nizhniy Novgorod, Russian Federation;
Shutova I.V., PhD (Medicine), Head of the Second Infection Diseases Department, Infectious Diseases Clinic, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific and Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Rospotrebnadzor, Nizhniy Novgorod, Russian Federation;
Novikov V.V., PhD, MD (Biology), Professor, Head of the Immune Chemistry Laboratory, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific and Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Rospotrebnadzor, Nizhniy Novgorod, Russian Federation.

Поступила в редакцию 19.04.2021
Отправлена на доработку 30.10.2021
Принята к печати 25.12.2021

Received 19.04.2021
Revision received 30.10.2021
Accepted 25.12.2021

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2022, vol. 12, no. 2, pp. 315–322

Инфекция и иммунитет
2022, Т. 12, № 2, с. 315–322

GENETIC POLYMORPHISMS OF *HELICOBACTER PYLORI* CLINICAL ISOLATES IN ST. PETERSBURG, RUSSIA

A.V. Svarval[a], D.A. Starkova[a], R.S. Ferman[a], O.V. Narvskaya[a,b]

[a] *St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation*
[b] *St. Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology of the Ministry of Health of Russia, St. Petersburg, Russian Federation*

Abstract. *Introduction. Helicobacter pylori* was proved to be the principal causative agent of gastroduodenal disorders in human. Although Russian Federation is among the countries with a high prevalence of *H. pylori* infection (60–90%), currently there is a very limited number of studies evaluating *H. pylori* genotypes in Russia. *Objective.* Based on the assessment of virulence-associated *cagA, oipA*, and *vacA* genes, our study was aimed to determine *H. pylori* genotypes associated with the clinical outcomes in patients with *H. pylori* infection in St. Petersburg, Northwest Russia. *Materials and methods.* Using PCR for the detection of *cagA, oipA*, and *vacA* s, m, i allelic variants, we analyzed 61 *H. pylori* isolates isolated and cultured from biopsies collected during endoscopy of patients with chronic gastritis (G), duodenal ulcer (DU), and gastric cancer (GC). *Results.* The genetic diversity of *H. pylori* clinical isolates has been revealed (HGDI 0.88): 41 (67%) of 61 *H. pylori* isolates were *cagA*-positive, 38 (62%) — *oipA*-positive. The proportions of *cagA*+ isolates differed in patients with G (56.7%) and DU (80.9%) (p = 0.06). The s, m, and i allelic variants of the *vacA* gene were detected in all strains, although the *vacA* s1 allele was significantly dominant in patients with DU (95.2%) rather than with G (64.9%) (p = 0.01). The *vacA* alleles m1 and i1 in the isolates from patients with G and DU were found in almost equal proportions: 45.9% and 42.8% for m1 allele, 45.9% and 47.6% for i1 allele, respectively. Seven isolates (11.5%) were positive for different mixed combinations of vacA alleles s, m, and i. Noteworthy, all *vacA* s2 strains were *cagA*-negative and had the m2 allele. *OipA*+ strains were found in almost equal proportions in patients with G (62.2%) and DU (57.1%) (p = 0.71). All three *cagA*- and *oipA*-positive isolates from patients with GC carried *vacA* s1/m1/i1 alleles. Different combinations of virulence-associated determinants constituted 17 genetic profiles. The most common combined genotype *cagA+/oipA+/vacA* s1/m1/i1 comprised 18 (29.5%) *H. pylori* isolates. *Conclusion.* We have determined predominant genotypes in the *H. pylori* population in the Northwest of Russia. The significant association between *vacA* s1 genotype of the pathogen and clinical manifestations of *H. pylori* infection has been established in our study.

Key words: Helicobacter pylori, cagA gene, vacA gene, oipA gene, gastritis, duodenal ulcer, gastric cancer, virulence determinants, genomic polymorphism.

ГЕНОМНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *HELICOBACTER PYLORI* В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ, РОССИЯ

Сварваль А.В.[1], Старкова Д.А.[1], Ферман Р.С.[1], Нарвская О.В.[1,2]

[1] *ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия*
[2] *ФГБУ СПб НИИ фтизиопульмонологии Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия*

Резюме. *Введение. Helicobacter pylori* — основной возбудитель гастродуоденальных заболеваний человека. Несмотря на то что Российская Федерация относится к числу стран с высоким уровнем распространенности

Адрес для переписки:
Старкова Дарья Андреевна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологи им. Пастера.
Тел.: 8 (812) 233-21-49 (служебн.), 8 921 424-63-37 (моб.).
E-mail: dariastarkova13@gmail.com

Contacts:
Daria A. Starkova
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 233-21-49 (office), +7 921 424-63-37 (mobile).
E-mail: dariastarkova13@gmail.com

Для цитирования:
Сварваль А.В., Старкова Д.А., Ферман Р.С., Нарвская О.В. Геномный полиморфизм клинических изолятов Helicobacter pylori в Санкт-Петербурге, Россия // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 2. С. 315–322. doi: 10.15789/2220-7619-GPO-1744

Citation:
Svarval A.V., Starkova D.A., Ferman R.S., Narvskaya O.V. Genetic polymorphisms of Helicobacter pylori clinical isolates in St. Petersburg, Russia // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 2, pp. 315–322. doi: 10.15789/2220-7619-GPO-1744

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-GPO-1744

инфекции *H. pylori* (60–90%), в настоящее время довольно ограниченное количество исследований посвящено генетическому разнообразию *H. pylori* в России. Цель — на основании оценки генов вирулентности *cagA*, *oipA* и *vacA* изучить геномный полиморфизм клинических изолятов *H. pylori*, полученных от различных групп больных на территории Санкт-Петербурга, Россия. *Материалы и методы.* Изучен 61 штамм *H. pylori*, выделенных от пациентов с хроническим гастритом (ХГ), язвой двенадцатиперстной кишки (ЯДК) и раком желудка (РЖ). Стандартный метод ПЦР использовали для детекции генов *cagA*, *oipA* и аллельных вариантов гена *vacA* (s, m, i). *Результаты.* Установлена генетическая неоднородность 61 штамма *H. pylori* (HGDI 0.88): 41 (67%) штамм был *cagA*-позитивным, 38 (62%) были *oipA*-позитивными. Доли *cagA*+ штаммов различались у пациентов с ХГ (56,7%) и ЯДК (80,9%) (p = 0,06). Ген *vacA* в различных s-, m-, i-аллельных вариантах выявлен у всех штаммов. Доля штаммов аллельного варианта *vacA* s1 существенно превалировала у пациентов с ЯДК (95,2%) по сравнению с больными ХГ (64,9%) (p = 0,01). Аллели *vacA* m1 и i1 у штаммов от пациентов с ХГ и ЯДК были обнаружены почти в равных пропорциях: 45,9 и 42,8% для аллеля m1, 45,9 и 47,6% для аллеля i1 соответственно. Семь штаммов (11,5%) имели смешанные s, m и i генотипы. Все штаммы аллеля *vacA* s2 являлись *cagA*-негативными и несли аллель m2. Штаммы *oipA*+ практически в равных долях были обнаружены у больных ХГ (62,2%) и ЯДК (57,1%) (p = 0,71). Все три штамма от пациентов с РЖ являлись *cagA*- и *oipA*-позитивными и несли аллели *vacA* s1/m1/i1. Анализ результатов генотипирования позволил выявить 17 вариантов профилей (комбинированных генотипов). Наиболее распространенный комбинированный генотип *cagA+/oipA+/vacA* s1/m1/i1 включал 18 (29,5%) штаммов *H. pylori*. *Выводы.* В результате анализа геномного полиморфизма клинических изолятов *H. pylori*, выделенных от больных хеликобактериозом, были выявлены доминирующие генотипы популяции *H. pylori* в Санкт-Петербурге, Россия. Установлена связь генотипа *vacA* s1 возбудителя с клиническими проявлениями инфекции *H. pylori*.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori, ген cagA, ген vacA, ген oipA, гастрит, язва двенадцатиперстной кишки, рак желудка, гены вирулентности, геномный полиморфизм.*

Introduction

Helicobacter pylori, a microaerophilic gram-negative spiral-shaped bacteria, infects approximately 4.4 billion humans worldwide. Although most *H. pylori*-positive individuals remain asymptomatic, the infection may result in the development of gastritis, ulcer disease, gastric adenocarcinoma, and mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma [9].

The severity of gastroduodenal lesions in infected individuals depends on the environmental factors, host genetics, and the expression of a large variety of virulence factors in *H. pylori* strains that play a key role in the development of the infection. Presently, the most intensively studied are the vacuolating cytotoxin (VacA), cytotoxin-associated antigen A (CagA), and outer inflammatory protein (OipA) encoded by *vacA*, *cagA*, and *oipA* genes, respectively [9, 13].

The *vacA* gene found in the genome of all *H. pylori* strains encodes a cytotoxin (~140 kDa), inducing the vacuolization of gastric epithelial cells through the formation of anion-selective pores in the cytoplasmic membrane. The genetic diversity of *H. pylori* strains is associated with *vacA* allelic variants s (alleles s1/s2), i (alleles i1/i2/i3), and m (alleles m1/m2) due to the mosaic structure of the *vacA* gene [5, 23]. The product of *vacA* in *H. pylori* s1/m1/i1 genotype strains is considered the most cytotoxic and associated with ulcer disease and gastric carcinoma compared with strains of other genotypes [11].

The primary determinant of *H. pylori* virulence is the cag pathogenicity island (*cag*PAI) believed to contribute to clinical outcomes, which seems controversial. For instance, a strong association between *cagA* status and severity of the disease was reported in the developed European countries [15]. In Russia and most Asian countries, such contribution was not proved [18, 21]. The *cag*PAI genes encode for the type IV secretion system proteins that transport the immunogenic CagA protein to the epithelial cells of the gastric mucosa. Further phosphorylation of CagA by host protein kinases results in the morphological changes in epithelial cells that stimulate ulceration, atrophy, and stomach cancer [8]. The marker of the cagPAI is the *cagA* gene, which is present in the genome of 25–99% of *H. pylori* strains depending on their geographical origin [15, 18, 21].

The outer membrane protein OipA, a member of the HOP protein family (Helicobacter outer proteins), is encoded by the *oipA* gene, which can be functionally active ("on") or inactive ("off") due to regulation by the repeated CT motif in the nucleotide sequence. OipA protein provides adhesion of *H. pylori* to gastric epithelial cells and is associated with interleukin-8 induction and neutrophil infiltration of the gastric mucosa in inflammation and duodenal ulcer [6].

Although Russia belongs to countries with a high prevalence of *H. pylori* infection (70–90% depending on the region), currently there is a very limited number of studies evaluated *H. pylori* genotypes in Russia. Based on the assessment of virulence-associated *cagA*, *oipA*, and *vacA* genes, our study was aimed to determine *H. pylori* genotypes associated with the clinical outcomes in patients with *H. pylori* infection in St. Petersburg, Northwest Russia.

Materials and methods

Bacterial strains, culture conditions, and identification

A total of 240 patients with a confirmed diagnosis of *H. pylori* infection from three different hospitals (in St. Petersburg) were recruited between 2014 and 2019. From this cohort, only 122 biopsies from both the corpus and antral mucosa taken during endoscopy from 61 patients were available. The study group included 28 men (45.9%) and 33 women (54.1%). The median age was 44 years (range 17–88 years). Regarding endoscopic findings and histological routine results, 61 patients were distributed into chronic gastritis (n = 37, 60.7%), duodenal ulcer (n = 21, 34.4%) and gastric cancer (n = 3, 4.9%) groups. The retrospective study was approved by the Independent Ethics Committee of St. Petersburg Pasteur Institute, Russia (Protocol No. 50/04-2019, 22.06.2020).

Endoscopic biopsy specimens were homogenized and used for the culture. The *H. pylori* culture was carried out at St. Petersburg Pasteur Institute (Russia) on a medium containing Columbia agar base with the addition of 5–7% defibrinated horse blood and 1% IsoVitalex solution at 37°C under microaerophilic conditions (oxygen content ~ 5%) using anaerostats of the GasPak 100 System. Visible growth of bacteria was observed after 4–7 days. For primary identification, Gram-stained culture smears were studied by microscopy. The urease, catalase, and oxidase biochemical tests were used for species identification. The strains were identified as *H. pylori* if all tests were positive. Strain *H. pylori* NCTC 12823 was used as a reference.

DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR) assays

Isolation of chromosomal DNA *H. pylori* was performed using a set of Helicopol II produced by Litech Laboratories (Moscow).

The PCR for the detection of *cagA*, *oipA*, and *vacA* genes in the DNA samples was performed in the Bio-Rad C1000 Thermal Cycler (USA). The nucleotide sequences of the primers, the annealing temperatures, and the lengths of amplification products are shown in Table 1.

PCR protocol: 95°C — 3 min.; 35 cycles: 94°C — 35 sec, annealing temperature — 35 sec, 72°C — 45 sec; 72°C — 5 min. PCR products were separated in a 2% agarose gel stained with ethidium bromide. The length of amplification products was determined using molecular weight markers of 50 bp and 100 bp DNA Ladder (LLC Interlabservis, Moscow). The results were visualized using the GelDoc gel documentation system (BioRad, USA).

Statistical analysis

The statistical analysis of group comparison was performed using SPSS for Windows statistical software (version 12; StatSoft Inc., Chicago, IL, USA) and the OpenEpi (a Web-based Epidemiologic and Statistical Calculator for Public Health [www.OpenEpi.com]) for two-by-two tables to calculate the odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) and the Fisher exact test (one-tailed). A p-value < 0.05 was considered statistically significant.

To quantitatively evaluate the variability of *cagA*, *oipA*, and *vacA* genes, the Hunter–Gaston discriminatory index was calculated (HGDI) using a Discriminatory Power Calculator algorithm (http://insilico.ehu.es/mini_tools/discriminatory_power/index.php).

Results

The culture of biopsies on a selective nutrient medium at 37°C in microaerophilic conditions after 4–7 days resulted in the visible growth of typically small (about 1 mm diameter), round, smooth, transparent, moist colonies containing Gram-negative curved/S-shaped rods. Positive results of biochemi-

Table 1. Primers used for PCR detection of *oipA*, *cagA*, and *vacA* genes

Genes	Primers	Sequences of primers	Annealing temperature, °C	Length of the PCR product, bp	Reference
oipA	OipA-F OipA-R	GTTTTTGATGCATGGGATTTGTGCAT CTCTTATGGCTTT	53	401	[29]
cagA	CagA-F CagA-R	GATAACAGGCAAGCTTTTGAGGCTG CAAAAGATTGTTTGGCAGA	56	349	[26]
vacA s1/s2	VAI-F VAI-R	ATGGAAATACAACAAACACACCTGC TTGAATGCGCCAAAC	53	259/286	[5]
vacA m1/m2	VAG-F VAG-R	CAATCTGTCCAATCAAGCGAGGCGT CAAAATAATTCCAAGG	52	570/645	[30]
vacA i1	VacF1 VacA-C1R	GTTGGGATTGGGGGAATGCCGTTAA TTTAACGCTGTTTGAAG	52	426	[23]
vacA i2	VacF1 VacA-C2R	GTTGGGATTGGGGGAATGCCGGAT CAACGCTCTGATTTGA	52	432	[23]

cal tests (the ability to produce catalase, oxidase, and urease) allowed us to identify 61 bacterial isolates as *H. pylori* species.

The PCR-based examination of DNA samples revealed the genetic diversity of *H. pylori* clinical isolates in terms of the presence of virulence-associated genes *cagA*, *oipA*, and the distribution of *vacA* allelic variants (HGDI 0.88) (Table 2). The 41 (67%) of 61 strains were *cagA*-positive, 38 (62%) — *oipA*-positive; the *vacA* gene in various allelic variants was detected in all strains. The s1 (77%), m2 (49%), and i1 (49%) alleles were the most frequent in polymorphic s, m, and i regions of the *vacA* gene. Seven isolates (11.5%) were positive for different mixed combinations of *vacA* alleles s, m, and i (Table 2). Such cases may indicate the presence of multiple strains in the human body.

Allelic variants of three regions of the *vacA* gene were grouped into five genotypes, among them *vacA* s1/m1/i1 was dominant (41%). The *vacA* s1/m2/i2 and vacA s2/m2/i2 genotypes included 10 and 12 strains (16% and 20%), respectively. Noteworthy, a rare s2/m1 genotype was not found in our study.

To assess the association of pathogen's virulence determinants with the severity of gastroduodenal lesions due to *H. pylori* infection, we analyzed the distribution of *cagA*, *oipA*, and *vacA* genes in *H. pylori* clinical isolates from patients diagnosed with chronic gastritis (G), duodenal ulcer (DU) and gastric cancer (GC) (Table 2).

The proportions of *cagA*+ *H. pylori* strains differed depending on the clinical manifestations. In patients with G it was 56.7%, while in patients with DU reached 80.9%, however, the difference was not statistically significant [p = 0.06; OR 3.24 (0.91; 11.52)].

The distribution of strains bearing *vacA* s1 allele significantly differed in patients with G (64.9%) and DU (95.2%): [p = 0.01; OR 10.833 (1.30; 90.14)]. The *vacA* alleles m1 and i1 in the isolates from patients with G and DU were found in almost equal proportions: p = 0.82 (for allele m1) and p = 0.90 (for allele i1).

Also, no statistical difference between the *oipA* status and severity of the disease was detected: the proportions of *oipA*+ strains in patients with G (62.2%) and DU (57.1%) were almost equal (p = 0.71).

All isolates from patients with GC were *cagA*-, *oipA*-positive, and carried vacA s1/m1/i1 alleles (Table 2).

Further analysis of the *vacA*- and *cagA*-associated polymorphism in *H. pylori* clinical isolates revealed a relationship between the *cagA*+ status and the allelic variant s1 of the *vacA* gene: among 41 *cagA*-positive strains 39 (95.1%) possessed the *vacA* s1 allele (two *cagA*+ strains had multiple genotype s1s2), while none of the *vacA* s2 bearing strains carried *cagA* gene. Noteworthy, all *vacA* s2 strains had the m2 allele (Table 3). Only 24 (58%) of *cagA*-positive strains were *vacA* m1. The majority (88%) of the *vacA* s1/m1/i1 allelic profile strains were *cagA*-positive. The majority of *oipA*-positive isolates (87%) were carriers of the *cagA* gene.

The proportion of *cagA*+/*vacA*s1 genotype strains in patients with G reached 51%, compared to larger proportions in patients with DU (81%) and GC (100%). Only one of the 21 isolates from patients with DU had the *cagA*-/*vacA*s2 genotype.

Table 2. Genotypes of *H. pylori* clinical isolates from different patient groups

H. pylori genotype	G, N (%) (n = 37)	DU, N (%) (n = 21)	GC, N (%) (n = 3)	Total, N (%) (n = 61)
cagA+	21 (56.7%)	17 (80.9%)	3 (100%)	41 (67.2%)
oipA+	23 (62.2%)	12 (57.1%)	3 (100%)	38 (62.3%)
vacA s1	24 (64.9%)	20 (95.2%)	3 (100%)	47 (77.0%)
vacA s2	11 (29.7%)	1 (4.8%)	–	12 (19.7%)
vacA s1s2	2 (5.4%)	–	–	2 (3.3%)
vacA m1	17 (45.9%)	9 (42.8%)	3 (100%)	29 (47.5%)
vacA m2	18 (48.6%)	12 (57.1%)	–	30 (49.2%)
vacA m1m2	2 (5.4%)	–	–	2 (3.3%)
vacA i1	17 (45.9%)	10 (47.6%)	3 (100%)	30 (49.2%)
vacA i2	17 (45.9%)	7 (33.3%)	–	24 (39.3%)
vacA i1i2	3 (8.1%)	4 (19.0%)	–	7 (11.5%)
vacA s1/m1/i1	17 (48.5%)	11 (47.8%)	3 (100%)	31 (50.8%)
vacA s2/m2/i2	11 (31.4%)	1 (4.3%)	–	12 (19.7%)
vacA s1/m2/i2	4 (11.4%)	9 (39.1%)	–	13 (21.3%)
vacA s1/m2/i1	3 (8.5%)	2 (8.6%)	–	5 (8.2%)
vacA s1/m2/i1i2	–	3 (14.3%)	–	3 (4.9%)
vacA s1/m1/i1i2	–	1 (4.8%)	–	1 (1.6%)
vacA s1s2/m1m2/i1i2	1 (2.7%)	–	–	1 (1.6%)
vacA s1s2/m1/i1i2	1 (2.7%)	–	–	1 (1.6%)
vacA s1/m1m2/i1i2	1 (2.7%)	–	–	1 (1.6%)

Different combinations of *cagA/oipA/vacA* alleles in 61 clinical *H. pylori* isolates were grouped in 17 profiles, five of which represented multiple genotypes (Table 4). The most common variant was *cagA+/oipA+/vacA*s1/m1/i1 which comprised 18 (30%) of the strains isolated from patients with G, DU, and GC. The remaining genotypes were represented by groups, including 1 to 6 strains.

Discussion

The populations of *H. pylori* appear heterogenic in different countries with variable ethnic, socioeconomic, and environmental characteristics. The polymorphisms in *cagA* and *vacA* genes associated with virulence are widely exploited for the genotyping of *H. pylori* strains. The presence of the *cagA* gene (a marker of the pathogenicity island, *cag*PAI) varies among *H. pylori* strains of different geographical origin: ~80–99% in East Asian countries [14, 21], Southeast and South Asia [20, 22, 27], South Africa [24]; ~50–70% in countries of Western Europe [7, 12, 15, 17]; ~50% and lower in the countries of the Middle East [10, 19]. According to the studies conducted in the Russian Federation, the presence of *cagA*-positive *H. pylori* strains varies in different regions: 80–90% in Moscow (Central region) [18] and Yekaterinburg (Ural Federal District) [3], 70–80% in Rostov-on-Don, Astrakhan (Southern Federal District) [2], 30–60% in Eastern Siberia [25], < 50% in Kazan (Volga Federal District) [1].

In this study, we detected about 67% of *cagA*-positive *H. pylori* strains among patients from St. Petersburg, which is consistent with data from Europe. In particular, in Finland, the proportion of *cagA+ H. pylori* strains reached 66%. The observed similarities may be partly explained by the territorial neighborhood and close communication between St. Petersburg Region, Russia, and Finland.

It is generally accepted that CagA-negative *H. pylori* strains are less virulent than CagA-positive strains causing severe gastrointestinal lesions in humans. The *cagA*-positive strains are reported in 80–100% of patients with DU and GC in Europe. In our study, the *cagA* gene was observed in *H. pylori* isolates from patients with DU (81%) and GC (100%), which is consistent with the previously published data [7, 15, 17]. In Asia, almost all strains of *H. pylori* carry the *cagA* gene, regardless of the infection severity [21], thus emphasizing the role of the CagA protein as a pathogen's virulence factor.

The *vacA* gene is known to be present in the genome of all *H. pylori* strains. However, different levels of cytotoxic activity of the VacA protein are associated with the diversity of allelic variants in the s-, m-, and i-regions of the *vacA* gene [11, 23].

We have established an association between the *vacA* s1 allele and DU since only one of the 21 *H. pylori* strains possessed an alternative *vacA* s2.

Table 3. The distribution of *vacA* and *oipA* profiles in *cagA*-positive and *cagA*-negative *H. pylori* clinical isolates

H. pylori genotype	*cagA+*, N (%) (n = 41)	*cagA–*, N (%) (n = 20)	Total, N (%) (n = 61)
vacA s1	39 (95.1%)	8 (40.0%)	47 (77.0%)
vacA s2	–	12 (60.0%)	12 (19.6%)
vacA m1	24 (58.5%)	5 (25.0%)	29 (47.5%)
vacA m2	15 (36.6%)	15 (75.0%)	30 (49.2%)
vacA i1	26 (63.4%)	4 (20.0%)	30 (49.2%)
vacA i2	8 (19.5%)	16 (80.0%)	24 (39.3%)
vacA s1/m1/i1	22 (53.6%)	3 (15.0%)	25 (40.9%)
vacA s1/m2/i1	4 (9.7%)	1 (5.0%)	5 (8.2%)
vacA s1/m2/i2	8 (19.5%)	2 (10.0%)	10 (16.4%)
vacA s2/m2/i2	–	12 (60.0%)	12 (19.7%)
oipA+	33 (80.5%)	5 (25.0%)	38 (62.3%)
oipA–	8 (19.5%)	15 (75.0%)	23 (37.7%)
vacA s1s2/m1m2/i1i2	1 (2.4%)	–	1 (1.6%)
vacA s1s2/m1/i1i2	1 (2.4%)	–	1 (1.6%)
vacA s1/m1m2/i1i2	1 (2.4%)	–	1 (1.6%)
vacA s1/m1/i1i2	1 (2.4%)	–	1 (1.6%)
vacA s1/m2/i1i2	3 (7.3%)	–	3 (4.9%)

Interestingly, that *vacA* s2 allele was predominant in *H. pylori* isolates from patients with G (~92%). No similar association was found in the m-variants of the *vacA* gene: the m1 and m2 alleles were distributed almost equally among clinical isolates from patients with G (45.9% and 48.6%, respectively) and DU (42.8% and 57.1%, respectively). In contrast to the widespread opinion on the leading role of the *H. pylori vacA* s1/m1 genotype in the development of a duodenal ulcer, our data did not confirm such association: we observed almost similar proportions of the s1/m1 and s1/m2 genotypes in patients with DU (42.8% and 52.4%, respectively). However, the s1/m1 genotype was detected in *H. pylori* isolates from patients with GC (though the number of such isolates was limited to three in our study), which is consistent with the reports from the Netherlands and Portugal [4, 28]. These data suggest a variety of *H. pylori* virulence determinants associated with the severity of lesions during infection of the gastrointestinal tract.

Polymorphism of the intermediate i region of the *vacA* gene is determined by alternative alleles i1/i2. According to the published data, the *vacA* i1 allele appears more informative than the s1/m1 allele and can be considered as an independent "marker" of gastric cancer [14].

We found that all *vacA* s1/m1 and *vacA* s2/m2 *H. pylori* isolates carried the i1 (*vacA* s1/m1/i1) and i2 (*vacA* s2/m2/i2) alleles, respectively. On the contrary, *vacA* s1/m2 genotype isolates appeared heterogeneous in the i-region (*vacA* s1/m2/i1 and *vacA* s1/m2/i2), which is in line with other reports [14, 21]. All *H. pylori*

Table 4. Combined genotypes of *H. pylori* clinical isolates from different patient groups

Combined *H. pylori* genotypes	G (n = 37)	DU (n = 21)	GC (n = 3)	Total (n = 61)
cagA+/*oipA*+/*vacA* s1/m1/i1	10 (27.0%)	5 (23.8%)	3 (100%)	18 (29.5%)
cagA+/*oipA*+/*vacA* s1/m2/i2	3 (8.1%)	3 (14.3%)	–	6 (9.8%)
cagA+/*oipA*+/*vacA* s1/m2/i1	2 (5.4%)	–	–	2 (3.3%)
cagA+/*oipA*–/*vacA* s1/m1/i1	2 (5.4%)	2 (9.5%)	–	4 (6.5%)
cagA+/*oipA*–/*vacA* s1/m2/i1	1 (2.7%)	1 (4.8%)	–	2 (3.3%)
cagA+/*oipA*–/*vacA* s1/m2/i2	–	2 (9.5%)	–	2 (3.3%)
cagA–/*oipA*+/*vacA* s2/m2/i2	5 (13.5%)	–	–	5 (8.2%)
cagA–/*oipA*–/*vacA* s1/m1/i1	2 (5.4%)	1 (4.8%)	–	3 (4.9%)
cagA–/*oipA*–/*vacA* s1/m1/i2	2 (5.4%)	–	–	2 (3.3%)
cagA–/*oipA*–/*vacA* s1/m2/i2	1 (2.7%)	1 (4.8%)	–	2 (3.3%)
cagA–/*oipA*–/*vacA* s2/m2/i2	6 (16.2%)	1 (4.8%)	–	7 (11.5%)
cagA–/*oipA*–/*vacA* s1/m2/i1	–	1 (4.8%)	–	1 (1.6%)
cagA+/*oipA*+/*vacA* s1s2/m1m2/i1i2	1 (2.7%)	–	–	1*(1.6%)
cagA+/*oipA*+/*vacA* s1s2/m1/i1i2	1 (2.7%)	–	–	1 (1.6%)
cagA+/*oipA*+/*vacA* s1/m1m2/i1i2	1 (2.7%)	–	–	1 (1.6%)
cagA+/*oipA*+/*vacA* s1/m1/i1i2	–	1 (4.8%)	–	1 (1.6%)
cagA+/*oipA*+/*vacA* s1/m2/i1i2	–	3 (14.3%)	–	3 (4.9%)

isolates from patients with gastric cancer (n = 3) were carriers of the *vacA* i1 allele combined with s1/m1. However, there was no correlation of *vacA* i1 genotype with other forms of *H. pylori* infection: 45.9% *vacA* i1 isolates from patients with G versus 47.6% from patients with DU. Thus, a large-scale assessment of the *vacA* i1 allele as a putative marker of predisposition to gastric cancer is necessary.

Based on the *vacA* genotyping, our results suggest the coexistence of multiple genetically different *H. pylori* strains in various gastric sites resulting from the mixt infection in a considerable number of patients (7/61, 11.5%).

An analysis of the *H. pylori cagA* and *vacA* combined genotypes demonstrated, firstly, the association of the *cag*PAI region with the *vacA* s1 allele and the absence of *cag*PAI in *vacA* s2 strains; secondly, the association of DU with the *vacA* s1 genotype. The *vacA* s2 strains were unique for patients with G. These data support the generally accepted opinion that *vacA* s1 strains increase the risk of developing DU and GC, while *vacA* s2 strains are less virulent and rarely associated with the progress of *H. pylori* infection. The *vacA* i1 and *vacA* m1 genotypes of *H. pylori* isolates were not associated with DU.

It is believed that the functionally active *oipA* gene is associated with the presence of the *cagA* gene, which, in turn, is associated with the *H. pylori vacA* s-region [16, 30]. However, their relationships remain unclear, taking into account the mutual remoteness of the *oipA*, *cagA*, and *vacA* genes on the bacterial chromosome.

In our study, a functionally active *oipA*+ gene was found in 62% of *H. pylori* isolates, while several studies reported the presence of the *oipA* gene in 90–100% strains [6, 16]. Most *oipA*-positive isolates (80%) carried the *cagA* gene. We did not find links between the presence of *oipA* gene and *H. pylori*-mediated diseases: the frequency of *oipA*+ strains in patients with G and DU was similar (60%). At the same time, the *oipA*+ isolates have predominated in patients with GC (100%), though the low number of gastric cancer cases in our study did not allow us to confirm an association.

The present study revealed the dominant combined genotype *cagA*+/*oipA*+/vacA s1/m1/i1 in *H. pylori* clinical isolates (30%). Our results inspire to search for reliable genetic markers associated with various clinical manifestations of *H. pylori* infection.

Conclusion

In conclusion, the PCR-based analysis of virulence determinants in clinical isolates revealed heterogeneity and the predominant genotypes in the *H. pylori* population in St. Petersburg, Russia. Although Russia belongs to countries with a high prevalence of *H. pylori* infection, a relatively low proportion of the *cagA*-bearing isolates were detected, and they were not significantly associated with duodenal ulcer. The significant association between the *vacA* s1 genotype of the pathogen and clinical manifestations of *H. pylori* infection has been established. Despite the limitations in the number of specimens, this finding may serve as a potential predictor for the *H. pylori* disease progression. A large-scale assessment is a demand to reveal the actual risk in developing gastroduodenal diseases due to *H. pylori* infection in Russia. In general, our study gained new insights into the *H. pylori* genetic structure in St. Petersburg, thus contributing to Russian and global pathogen population characterizations.

References

1. Ахтереева А.Р., Давидюк Ю.Н., Файзуллина Р.А., Ивановская К.А., Сафин А.Г., Сафина Д.Д., Абдулхаков С.Р. Распространенность генотипов Helicobacter pylori у пациентов с гастродуоденальной патологией в Казани // Казанский медицинский журнал. 2017. Т. 98, № 5. С. 723–728. [Akhtereeva A.R., Davidyuk Y.N., Faizullina R.A., Ivanovskaya K.A., Safin A.G., Safina D.D., Abdulkhakov S.R. Prevalence of Helicobacter pylori genotypes in patients with gastroduodenal pathology in Kazan. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal, 2017, vol. 98, no. 5, pp. 723–728. (In Russ.)*] *doi: 10.17750/KMJ2017-723*
2. Сорокин В.М., Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Голубкина Е.В., Березняк Е.А. Сравнительный анализ генотипов штаммов Helicobacter pylori в Ростовской и Астраханской области // Медицинский вестник Юга России. 2018. Т. 9, № 4. С. 81–86. [Sorokin V.M., Pisanov R.V., Vodop'janov A.S., Golubkina E.V., Bereznjak E.A. Comparative analysis of genotypes of Helicobacter pylori strains in the Rostov and Astrakhan regions. *Medicinskij vestnik Yuga Rossii = Medical Herald of the South of Russia, 2018, vol. 9, no. 4, pp. 81–86. (In Russ.)*] *doi: 10.21886/2219-8075-2018-9-4-81-86*
3. Щанова Н.О., Прохорова Л.В. Возможности повышения эффективности эрадикации Helicobacter pylori у больных язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2016. № 2. С. 11–18. [Schanova N.O., Prokhorova L.V. Improvement of Helicobacter pylori eradication efficacy at stomach and duodenum peptic ulcers. *Rossiiskii zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii = Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology, 2016, no. 2, pp. 11–18. (In Russ.)*]
4. Almeida N., Donato M.M., Romãozinho J.M., Luxo C., Cardoso O., Cipriano M.A., Marinho C., Fernandes A., Sofia C. Correlation of Helicobacter pylori genotypes with gastric histopathology in the central region of a South-European country. *Dig. Dis. Sci., 2015, vol. 60, no. 1, pp. 74–85. doi: 10.1007/s10620-014-3319-8*
5. Atherton J.C., Cao P., Peek R.M., Tummuru M.K., Blaser M.J., Cover T.L. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of Helicobacter pylori. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J. Biol. Chem., 1995, vol. 270, pp. 17771–17777. doi: 10.1074/jbc.270.30.17771*
6. Braga L.L.B.C., Batista M.H.R., de Azevedo O.G.R., da Silva Costa K.C., Gomes A.D., Rocha G.A., Queiroz D.M.M. OipA "on" status of Helicobacter pylori is associated with gastric cancer in North-Eastern Brazil. *BMC Cancer, 2019, vol. 19, no. 1: 48. doi: 10.1186/s12885-018-5249-x*
7. Chiarini A., Calà C., Bonura C., Gullo A., Giuliana G., Peralta S., D'Arpa F., Giammanco A. Prevalence of virulence-associated genotypes of Helicobacter pylori and correlation with severity of gastric pathology in patients from western Sicily, Italy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 2009, vol. 28, pp. 437–446. doi: 10.1007/s10096-008-0644-x*
8. Da Costa D.M., Pereira Edos S., Rabenhorst S.H. What exists beyond cagA and vacA? Helicobacter pylori genes in gastric diseases. *World J. Gastroenterol., 2015, vol. 21, no. 37, pp. 10563–10572. doi: 10.3748/wjg.v21.i37.10563*
9. De Brito B.B., da Silva F.A.F., Soares A.S., Pereira V.A., Santos M.L.C., Sampaio M.M., Neves P.H.M., de Melo F.F. Pathogenesis and clinical management of Helicobacter pylori gastric infection. *World. J. Gastroenterol., 2019, vol. 25, no. 37, pp. 5578–5589. doi: 10.3748/wjg.v25.i37.5578*
10. Diab M., Shemis M., Gamal D., El-Shenawy A., El-Ghannam M., El-Sherbini E. Helicobacter pylori Western cagA genotype in Egyptian patients with upper gastrointestinal disease. *EJMHG, 2018, vol. 19, no. 4, pp. 297–300. doi: 10.1016/j.ejmhg.2018.06.003*
11. Foegeding N.J., Caston R.R., McClain M.S., Ohi M.D., Cover T.L. An overview of Helicobacter pylori VacA toxin biology. *Toxins (Basel), 2016, vol. 8, no. 6: e173. doi: 10.3390/toxins8060173*
12. Heikkinen M., Mayo K., Mégraud F., Vornanen M., Marin S., Pikkarainen P., Julkunen R. Association of CagA-positive and CagA-negative Helicobacter pylori strains with patients' symptoms and gastritis in primary care patients with functional upper abdominal complaints. *Scand. J. Gastroenterol., 1998, vol. 33, no. 1, pp. 31–38. doi: 10.1080/00365529850166176*
13. Imkamp F., Lauener F.N., Pohl D., Lehours P., Vale F.F., Jehanne Q., Zbinden R., Keller P.M., Wagner K. Rapid characterization of virulence determinants in Helicobacter pylori isolated from non-atrophic gastritis patients by next-generation sequencing. *J. Clin. Med., 2019, vol. 8, no. 7: 1030. doi: 10.3390/jcm8071030*
14. Inagaki T., Nishiumi S., Ito Y., Yamakawa A., Yamazaki Y., Yoshida M., Azuma T. Associations between cagA, vacA, and the clinical outcomes of Helicobacter pylori infections in Okinawa, Japan. *Kobe J. Med. Sci., 2017, vol. 63, no. 2, pp. 58–67.*
15. Kamogawa-Schifter Y., Yamaoka Y., Uchida T., Beer A., Tribl B., Schöniger-Hekele M., Trauner M., Dolak W. Prevalence of Helicobacter pylori and its CagA subtypes in gastric cancer and duodenal ulcer at an Austrian tertiary referral center over 25 years. *PLoS One, 2018, vol. 13, no. 5: e0197695. doi: 10.1371/journal.pone.0197695*
16. Liu J., He C., Chen M., Wang Z., Xing C., Yuan Y. Association of presence/absence and on/off patterns of Helicobacter pylori oipA gene with peptic ulcer disease and gastric cancer risks: a meta-analysis. *BMC Infect. Dis., 2013, 13: 555. doi: 10.1186/1471-2334-13-555*
17. Miehlke S., Kirsch C., Agha-Amiri K., Günther T., Lehn N., Malfertheiner P., Stolte M., Ehninger G., Bayerdörffer E. The Helicobacter pylori vacA s1, m1 genotype and cagA is associated with gastric carcinoma in Germany. *Int. J. Cancer, 2000, vol. 87, no. 3, pp. 322–327.*
18. Momynaliev K., Smirnova O., Kudryavtseva L., Govorun V. Helicobacter pylori genotypes in Russia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 2003, vol. 22, no. 9, pp. 573–574. doi: 10.1007/s10096-003-0987-2*
19. Muhsen K., Sinnereich R., Beer-Davidson G., Nassar H., Abu Ahmed W., Cohen D., Kark J.D. Correlates of infection with Helicobacter pylori positive and negative cytotoxin-associated gene A phenotypes among Arab and Jewish residents of Jerusalem. *Epidemiol. Infect., 2019, vol. 147: e276. doi: 10.1017/S0950268819001456*
20. Mukhopadhyay A.K., Kersulyte D., Jeong J.Y., Datta S., Ito Y., Chowdhury A., Santra A., Bhattacharya S.K., Azuma T., Nair G.B., Berg D.E. Distinctiveness of genotypes of Helicobacter pylori in Calcutta, India. *J. Bacteriol., 2000, vol. 182, no. 11, pp. 3219–3227. doi: 10.1128/jb.182.11.3219-3227.2000*

21. Nguyen L.T., Uchida T., Murakami K., Fujioka T., Moriyama M. Helicobacter pylori virulence and the diversity of gastric cancer in Asia. *J. Med. Microbiol., 2008, vol. 57, no. 12, pp. 1445–1453. doi: 10.1099/jmm.0.2008/003160-0*
22. Rahman M., Mukhopadhyay A.K., Nahar S., Datta S., Ahmad M.M., Sarker S., Masud I.M., Engstrand L., Albert M.J., Nair G.B., Berg D.E. DNA-level characterization of Helicobacter pylori strains from patients with overt disease and with benign infections in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol., 2003, vol. 41, no. 5, pp. 2008–2014. doi: 10.1128/jcm.41.5.2008-2014.2003*
23. Rhead J.L., Letley D.P., Mohammadi M., Hussein N., Mohagheghi M.A., Eshagh Hosseini M., Atherton J.C. A new Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology, 2007, vol. 133, no. 3, pp. 926–936. doi: 10.1053/j.gastro.2007.06.056*
24. Tanih N.F., McMillan M., Naidoo N., Ndip L.M., Weaver L.T., Ndip R.N. Prevalence of Helicobacter pylori vacA, cagA and iceA genotypes in South African patients with upper gastrointestinal diseases. *Acta Trop., 2010, vol. 116, no. 1, pp. 68–73. doi: 10.1016/j.actatropica.2010.05.011*
25. Tsukanov V.V., Butorin N.N., Maady A.S., Shtygasheva O.V., Amelchugova O.S., Tonkikh J.L., Fassan M., Rugge M. Helicobacter pylori infection, intestinal metaplasia, and gastric cancer risk in Eastern Siberia. *Helicobacter, 2011, vol. 16, no. 2, pp. 107–112. doi: 10.1111/j.1523-5378.2011.00827.x*
26. Tumurru M.K., Cover T.L., Blaser M.J. Cloning and expression of a high-molecular mass major antigen of Helicobacter pylori: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect. Immun., 1993, vol. 61, pp. 1799–1809.*
27. Uchida T., Miftahussurur M., Pittayanon R., Vilaichone R.K., Wisedopas N., Ratanachu-Ek T., Kishida T., Moriyama M., Yamaoka Y., Mahachai V. Helicobacter pylori Infection in Thailand: A Nationwide Study of the CagA Phenotype. *PLoS One, 2015, vol. 10, no. 9: e0136775. doi: 10.1371/journal.pone.0136775*
28. Van Doorn L.J., Figueiredo C., Mégraud F., Pena S., Midolo P., Queiroz D.M., Carneiro F., Vanderborght B., Pegado M.D., Sanna R., De Boer W., Schneeberger P.M., Correa P., Ng E.K., Atherton J., Blaser M.J., Quint W.G. Geographic distribution of vacA allelic types of Helicobacter pylori. *Gastroenter., 1999, vol. 116, no. 4, pp. 823–830. doi: 10.1016/s0016-5085(99)70065-x*
29. Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in Eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res., 1991, vol. 19, pp. 6823–6831. doi: 10.1093/nar/19.24.6823*
30. Yamaoka Y., Kodama T., Gutierrez O., Kim J.G., Kashima K., Graham D.Y. Relationship between Helicobacter pylori iceA, cagA, and vacA status and clinical outcome: studies in four different countries. *J. Clin. Microbiol., 1999, vol. 37, pp. 2274–2279.*

Авторы:
Сварваль А.В., к.м.н., старший научный сотрудник, зав. лабораторией идентификации патогенов ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Старкова Д.А., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории идентификации патогенов, научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Ферман Р.С., младший научный сотрудник лаборатории идентификации патогенов ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологи имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Нарвская О.В., д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия; научный консультант ФГБУ СПб НИИ фтизиопульмонологии Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:
Svarval A.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Head of the Pathogens Identification Laboratory, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Starkova D.A., PhD (Biology), Senior Researcher of the Pathogens Identification Laboratory, Researcher of the Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Ferman R.S., Junior Researcher, Pathogens Identification Laboratory, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Narvskaya O.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Researcher, Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Academic Adviser, St. Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology of the Ministry of Health of Russia, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 03.06.2021
Отправлена на доработку 30.10.2021
Принята к печати 22.01.2022

Received 03.06.2021
Revision received 30.10.2021
Accepted 22.01.2022

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2022, vol. 12, no. 2, pp. 323–330

Инфекция и иммунитет
2022, Т. 12, № 2, с. 323–330

ХАРАКТЕРИСТИКА ПАРАМЕТРОВ КЛЕТОЧНОГО И ГУМОРАЛЬНОГО ЗВЕНЬЕВ ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ МЕХАНИЧЕСКОЙ ЖЕЛТУХОЙ, ОБУСЛОВЛЕННОЙ ХОЛАНГИОКАРЦИНОМОЙ

О.В. Смирнова[1], Б.Г. Губанов[1], Э.В. Каспаров[1], М.А. Даренская[2], Л.И. Колесникова[2], С.Н. Колесников[2]

[1] *НИИ медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН, г. Красноярск, Россия*
[2] *ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия*

Резюме. В современном мире механическая желтуха (МЖ), обусловленная развитием злокачественного заболевания — холангиокарциномы, представляет значимую медицинскую и социальную проблему в экономически развитых и развивающихся странах. Целью настоящего исследования было изучение показателей клеточного и гуморального иммунитета у больных механической желтухой, вызванной холангиокарциномой, до и после ее хирургической коррекции. В исследование были включены 56 больных в возрасте 45–73 лет с механической желтухой, обусловленной холангиокарциномой ($T_{2-3}N_{0-1}M_0$ стадий), и 90 практически здоровых добровольцев аналогичного возраста. Показатели клеточного иммунитета изучали с помощью проточного цитометра FC500 (Beckman Coulter, США). Параметры гуморального иммунитета оценивали по содержанию иммуноглобулинов A, M, G, E методом иммуноферментного анализа с использованием наборов производства ЗАО «Вектор-Бест» (Россия). Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием программы Statistica v. 12.0 (StatSoft Inc., США). По результатам нашего исследования, у больных механической желтухой, обусловленной холангиокарциномой, выявлялась активация гуморального иммунитета, что подтверждалось увеличением содержания IgA, IgG, IgE в сыворотке крови, и существенная депрессия некоторых звеньев клеточного иммунитета, ведущая к нестабильности функционирования иммунной системы в целом. Дисбаланс клеточного звена иммунитета проявлялся уменьшением количества Т-хелперов и увеличением цитотоксических Т-лимфоцитов, снижением индекса соотношения $CD4^+/CD8^+$. Увеличенное количество цитотоксических Т-лимфоцитов указывает на снижение Т-клеточного иммунитета и о преобладании на клеточном уровне цитотоксических эффектов. Снижение количества pan-маркеров Т-лимфоцитов указывает на общее снижение активности Т-клеточного звена в результате изменения функции Т-клеток и ведет к нарушению антиген-презентирующей функции клеток

Адрес для переписки:
Смирнова Ольга Валентиновна
660022, Россия, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3г, НИИ медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН.
Тел.: 8 913 567-97-19.
E-mail: ovsmirnova71@mail.ru

Contacts:
Olga V. Smirnova
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk, Partizana Zheleznyaka str., 3g, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences.
Phone: +7 913 567-97-19.
E-mail: ovsmirnova71@mail.ru

Для цитирования:
Смирнова О.В., Губанов Б.Г., Каспаров Э.В., Даренская М.А., Колесникова Л.И., Колесников С.Н. Характеристика параметров клеточного и гуморального звеньев иммунитета у больных механической желтухой, обусловленной холангиокарциномой // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 2. С. 323–330. doi: 10.15789/2220-7619-CPO-1716

Citation:
Smirnova O.V., Gubanov B.G., Kasparov E.V., Darenskaya M.A., Kolesnikova L.I., Kolesnikov S.I. Characteristics of cellular and humoral immunity parameters in patients with mechanical jaundice, caused by cholangiocarcinoma // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 2, pp. 323–330. doi: 10.15789/2220-7619-CPO-1716

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-CPO-1716

иммунной системы. Развитие Т-клеточного иммунодефицита из-за апоптоза Т-лимфоцитов доказывает повышение экспрессии иммуномаркеров CD38⁺, CD95⁺. Увеличение сывороточного содержания некоторых иммуноглобулинов указывает на развитие дисбаланса гуморального звена иммунитета, а увеличение ЦИК свидетельствует о выраженной интоксикации организма за счет гипербилирубинемии из-за механической желтухи и распада опухолевых клеток. Хирургическое лечение механической желтухи способствовало нормализации показателей клеточного и гуморального звеньев иммунитета, способствуя тем самым достижению иммунокорригирующего эффекта.

Ключевые слова: *клеточный иммунитет, гуморальный иммунитет, механическая желтуха, холангиокарцинома, адаптивный иммунитет, лимфоциты, иммуноглобулины, механическая желтуха злокачественного генеза.*

CHARACTERISTICS OF CELLULAR AND HUMORAL IMMUNITY PARAMETERS IN PATIENTS WITH MECHANICAL JAUNDICE, CAUSED BY CHOLANGIOCARCINOMA

Smirnova O.V.[a], Gubanov B.G.[a], Kasparov E.V.[a], Darenskaya M.A.[b], Kolesnikova L.I.[b], Kolesnikov S.I.[b]

[a] *Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation*

[b] *Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation*

Abstract. In the modern world, obstructive jaundice caused by developing a malignant disease — cholangiocarcinoma, poses a significant medical and social problem in economically developed and in developing countries. The aim of this study was to examine parameters of cellular and humoral immunity in patients with obstructive jaundice caused by cholangiocarcinoma before and after surgical intervention. There were enrolled 56 patients with obstructive jaundice caused by cholangiocarcinoma (stages $T_{2-3}N_{0-1}M_0$) and 90 age-matched apparently healthy volunteers. Cellular immunity parameters were studied by using an FC500 flow cytometer (Beckman Coulter, USA). The parameters of humoral immunity were assessed by measuring level of serum immunoglobulins A, M, G, E by using enzyme-linked immunosorbent assay kits manufactured by Vector-Best (Russia). The results were statistically analyzed using the Statistica v. 12.0 software (StatSoft Inc., USA). According to the study results, in patients with obstructive jaundice caused by cholangiocarcinoma, there was revealed activation of humoral immunity due to increased serum level of IgA, IgG, IgE with a profoundly depressed some arms of cellular immunity contributing to the imbalanced work of the entire immune system. The imbalance in the cellular arm of immune system was manifested by decreased count of T helper and increased cytotoxic T cell subsets as well as decline in the CD4⁺/CD8⁺ T cell ratio. An increased count of cytotoxic T lymphocytes points at lowered T cell immunity and existence of a cytotoxic effect at the cellular level. A decrease in the count of pan-marker-positive T lymphocytes indicates about generally reduced activity of the T cell arm due to altered T cell function and, as a result, affected antigen-presenting function in immune cells. The development of T cell immunodeficiency due to T-cell apoptosis confirms upregulated expression of immunomarkers CD38⁺, CD95⁺. An increased serum level for some immunoglobulins suggests developing imbalance in the humoral immunity, whereas rise in the circulating immune complexes indicates about pronounced body intoxication caused by obstructive jaundice due to hyperbilirubinemia and disintegration of tumor cells. Application of surgical correction of obstructive jaundice contributed to normalizing parameters of cellular and humoral immunity, resulting in immunocorrective effect.

Key words: *cellular immunity, humoral immunity, obstructive jaundice, cholangiocarcinoma, adaptive immunity, lymphocytes, immunoglobulins, obstructive jaundice of malignant genesis.*

Введение

В современном мире механическая желтуха (МЖ), обусловленная развитием злокачественного заболевания — холангиокарциномы, — занимает одно из мест в структуре онкологической заболеваемости и смертности в развивающихся странах и представляет значимую медицинскую и социальную проблему в экономически развитых странах [1, 3, 23, 31]. В настоящее время хирургическая коррекция МЖ с последующей лучевой и химиотерапией считаются самыми эффективными способами лечения данного заболевания [2, 4, 5, 6]. Однако подобное терапевтическое воздействие является для пациента иммуносупрессивным, оказывает ингибирующее воздействие на костномозговое кроветворение, приводит к развитию инфекционных осложнений и дисбиотических изменений микрофлоры кишечника. Таким образом, данные пациенты нуждаются в проведении иммунокорригирующей терапии [18, 19, 29, 30].

При МЖ злокачественного генеза препятствие для оттока желчи сформировано злокачественной опухолью [7, 8, 10, 26, 27]. Гипербилирубинемия, интоксикация, воспаление, иммунокомплексные процессы, блокада макро-

фагальной системы способствуют повреждению органов-мишеней [17, 24, 25, 28]. При этом значительная роль в течение патологического процесса принадлежит клеточным и гуморальным факторам иммунной системы [20, 21, 22].

Цель настоящего исследования — изучение показателей клеточного и гуморального иммунитета у больных МЖ, вызванной холангиокарциномой, до и после ее хирургической коррекции.

Материалы и методы

В исследование были включены 56 больных с МЖ, обусловленной холангиокарциномой ($T_{2-3}N_{0-1}M_0$ стадий (II–III клинические стадии). Возраст обследованных больных был от 45 до 73 лет, средний возраст составил 57,3±5,03 лет. Все больные МЖ получали комплексное лечение, включающее хирургическую коррекцию МЖ в виде декомпрессии желчных протоков с дальнейшим назначением стандартной полихимиотерапии, операции и/или химиолучевой терапии или сочетанной лучевой терапии. Контрольную группу составили 90 практически здоровых добровольцев аналогичного возраста.

Материалом для исследования служила венозная кровь, которая забиралась у пациентов утром натощак из локтевой вены в вакутейнеры с гепарином при поступлении на стационарное лечение до операции и спустя 7 суток после проведенного лечения.

Показатели клеточного иммунитета изучали с помощью проточного цитометра FC500 (Beckman Coulter, США).

Параметры гуморального иммунитета оценивали по содержанию иммуноглобулинов A, M, G, E методом иммуноферментного анализа с использованием наборов производства ЗАО «Вектор-Бест» (Россия).

Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием программы Statistica v.12.0 (StatSoft Inc., США). Для оценки различий в группах использовались непараметрические критерии Краскела–Уоллиса (для трех и более групп сравнения) и Манна–Уитни (для попарного сравнения). Сравнение групп по качественному бинарному признаку проводилось с помощью двустороннего точного критерия Фишера. Данные представлены в виде Медианы (Q_{25}–Q_{75}).

Для выполнения поставленных задач были сформированы следующие группы пациентов: I группа — 90 (100%) практически здоровых добровольцев; II группа — 56 (100%) больных МЖ до ее хирургической коррекции и III группа — 54 (96,4%) больных МЖ после ее хирургической коррекции.

Результаты

При анализе показателей клеточного звена иммунитета было выявлено (табл.), что среднее количество лейкоцитов и лимфоцитов в периферической крови у всех больных с МЖ было снижено относительно контрольной группы. До проведения хирургической коррекции МЖ у пациентов снижалось общее содержание pan-маркеров Т-лимфоцитов ($CD3^+CD45^+$), Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$) по сравнению с контрольной группой. При этом у пациентов с МЖ после хирургической коррекции экспрессия данных иммунологических маркеров повышалась до уровня нормальных значений.

Изучение экспрессии $CD8^+$ на Т-лимфоцитах ($CD3^+CD8^+$) обнаружило первичное повышение данного иммуномаркера у всех больных МЖ до операции по сравнению со значениями контрольной группы и больных после хирургического вмешательства. В группе больных МЖ после операции выявлялось значительное уменьшение содержания цитотоксических Т-лимфоцитов (нормализация показателей этих клеток свидетельствует об уменьшении иммунодепрессии).

Важную роль при вторичных иммунодефицитных состояниях играет соотношение Т-хелперов к цитотоксическим лимфоцитам ($CD4^+/CD8^+$). У больных МЖ до операции обнаруживается снижение экспрессии $CD4^+$ и повышение экспрессии $CD8^+$, что свидетельствует о снижении данного соотношения. Проведение хирургической коррекции МЖ у больных холангиокарциномой способствует нормализации данного показателя.

Кроме того, у всех пациентов с МЖ до операции обнаруживалось достоверное увеличение экспрессии натуральных киллеров с фенотипом $CD16^+CD45^+$, после хирургической коррекции данный показатель снижался.

У больных МЖ до операции выявлялась низкая экспрессия $CD20^+CD45^+$-клеток, участвующих в развитии гуморального иммунитета. Данное состояние вероятно обусловлено выраженным иммунодепрессивным влиянием не только опухоли, но и собственно механической желтухой. Хирургическая коррекция МЖ повысила содержание клеток с данным маркером.

При оценке активационных маркеров иммунитета было выявлено, увеличение экспрессии иммуномаркера $CD23^+$ у больных МЖ до операции. $CD23^+$ является специфическим рецептором для иммуноглобулина E, под действием IL-4 он начинает активно экспрессироваться B-клетками и моноцитами. У пациентов МЖ после операции содержание $CD23^+$-клеток снижается.

Таблица. Состояние клеточных и гуморальных показателей иммунитета у больных механической желтухой, обусловленной холангиокарциномой (Me [C_{25}–C_{75}])

Table. Immune cellular and humoral parameters in patients with obstructive jaundice caused by cholangiocarcinoma (Me [C_{25}–C_{75}])

Показатели Parameters	**Контрольная группа** Control group **n = 90**	**Больные МЖ до операции** OJ patients before surgery **n = 56**	**Больные МЖ после операции** OJ patients after surgery **n = 54**	**P, критерий Краскела–Уоллиса** P, Kruskal–Wallis criterion
Клеточное звено иммунитета Cellular immunity				
Лейкоциты, × 10^9 Leukocytes, × 10^9	5,7 [4,82–7,47]	3,5 [3,3–3,8]*	5,3 [5,1–5,5]**	$p < 0,05$
Лимфоциты, % Lymphocytes, × 10^9	35,8 [31,9–44,9]	22,2 [20,8–27,6]*	26,7 [26,0–37,2]**	$p < 0,05$
Лимфоциты, × 10^9 Lymphocytes, × 10^9	2,17 [1,49–3,35]	1,7 [1,5–1,9]*	1,9 [1,7–2,1]	$p < 0,05$
$CD3^+CD45^+$, %	66 [60,0–75,0]	34,1 [32,4–42,0]*	62,7 [50,2–614,4]**	$p < 0,05$
$CD3^+CD45^+$, × 10^9	1,43 [0,93–2,42]	0,86 [0,7–0,92]*	1,33 [1–2,1]**	$p < 0,05$
$CD3^+CD4^+$, %	45,0 [34,01–48,87]	18,2 [16,7–23,9]*	37,8 [29,9–39,3]**	$p < 0,05$
$CD3^+CD4^+$, × 10^9	0,97 [0,52–1,61]	0,73 [0,7–0,94]*	0,89 [0,7–1,01]	$p < 0,05$
$CD3^+CD8^+$, %	27,0 [20,0–33,81]	36,2 [34,2–44,6]*	21,8 [17,2–29,2]**	$p < 0,05$
$CD3^+CD8^+$, × 10^9	0,58 [0,31–1,1]	0,76 [0,6–0,82]*	0,54 [0,42–0,64]	$p < 0,05$
$CD4^+/CD8^+$	1,5 [1,43–1,52]	0,5 [0,48–0,54]*	1,3 [0,9–1,4]**	$p < 0,05$
$CD16^+CD45^+$, %	18,0 [13,89–21,3]	20,6 [19,1–25,7]*	19,6 [18,1–26,4]	$p < 0,05$
$CD16^+CD45^+$, × 10^9	0,33 [0,16–0,47]	0,54 [0,46–0,62]*	0,44 [0,4–0,6]	$p < 0,05$
$CD20^+CD45^+$, %	14 [8,2–15,89]	10,1 [9,9–12,1]*	13,1 [9,9–15,0]	$p < 0,05$
$CD20^+CD45^+$, × 10^9	0,29 [0,13–0,462]	0,1 [0,07–0,23]*	0,23 [0,1–0,4]	$p < 0,05$
Активационное звено иммунитета Immune-related activation stastus				
$CD23^+$, %	20,2 [18,1–24,3]	26,01 [24,5–32,7]*	23,1 [20,4 -29,3]	$p < 0,05$
$CD38^+$, %	33,1 [30,2–35,7]	36,2 [29,2–39,3]*	34,3 [30,2–36,3]	$p < 0,05$
$CD95^+$, %	21,2 [19,3–25,3]	43,8 [29,4–47,3]*	26,4 [23,2–29,1]**	$p < 0,05$
Гуморальное звено иммунитета Humoral immunity				
IgA, г/л | g/l	2,0 [0,9–2,50]	16,6 [13,4–20,3]*	13,8 [11,8–16,1]*	$p < 0,05$
IgM, г/л | g/l	1,72 [0,65–2,8]	1,3 [0,9–1,5]	1,1 [0,9–1,5]	$p > 0,05$

Показатели Parameters	**Контрольная группа** Control group **n = 90**	**Больные МЖ до операции** OJ patients before surgery **n = 56**	**Больные МЖ после операции** OJ patients after surgery **n = 54**	**P, критерий Краскела–Уоллиса** P, Kruskal–Wallis criterion
Гуморальное звено иммунитета Humoral immunity				
IgG, г/л | g/l	11,8 [7,2–16,4]	18,9 [14,3–21,3]*	11,6 [9,3–14,2]	p < 0,05
IgE, МЕ/мл | IU/ml	80 [40–100]	123 [89–153]*	81 [77–121]**	p < 0,05
ЦИК, у.е. CIC, r.u.	41 [32–50]	187,2 [97–193]*	135,8 [121,2–143,4]*	p < 0,05

Примечание. * — достоверность различий с показателями контрольной группы, p < 0,05; ** — достоверность различий с группой больных МЖ до операции, p < 0,05.

Note. * — significant difference with parameters from control group, p < 0.05; ** — significant difference with the MJ patient group before surgery, p < 0.05.

У больных МЖ до операции выявляется наибольшее содержание иммуномаркера $CD38^+$, который выявляется на незрелых Т- и В-лимфоцитах, активированных Т-лимфоцитах и плазматических клетках, а у больных после операции показатель приближается к нормальным значениям. Увеличение экспрессии $CD38^+$ до хирургического лечения больных МЖ вероятно обусловлена высокой пролиферативной активностью Т- и В-лимфоцитов на фоне онкологического процесса и развития механической желтухи, в то время как снижение интоксикации и улучшение возможности реализации иммунного противоопухолевого ответа у больных МЖ после операции способствуют снижению экспрессии данного маркера. Кроме того, активация $CD38^+$ может быть обусловлена повышенной экспрессией $CD8^+$, $CD16^+$, $CD20^+$.

У больных МЖ до операции выявлялось увеличение экспрессии $CD95^+$-клеток, в то время как у больных после операции отмечалось снижение клеток с маркером апоптоза. Увеличение экспрессии соответствующего маркера апоптоза является специфическим признаком злокачественного заболевания, и приводит к уменьшению лимфоцитарного пула и развитию вторичного иммунодефицитного состояния.

При оценке гуморального звена иммунитета было обнаружено высокое содержание IgG, IgA у больных МЖ злокачественного генеза до операции, что может быть обусловлено наличием хронического воспаления и иммунодепрессии на фоне онкологического заболевания. У пациентов с МЖ после операции выявлялось снижение содержания обоих иммуноглобулинов. Содержание IgM в сыворотке крови у всех больных МЖ до и после операции было в пределах нормы. У больных МЖ до операции выявлялось увеличение содержания IgE, что расценивалось как неблагоприятный прогностический признак, после операции содержание IgE снижалось до нормы. Таким образом, гуморальное звено иммунитета у пациентов МЖ до операции характеризовалось гипергаммаглобулинемией по классам A, G и E, после операции отмечалась коррекция всех увеличенных иммуноглобулинов.

Кроме того, у пациентов с МЖ, обусловленной холангиокарциномой, определялись циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК). Известно наличие крупных и мелких ЦИК. ЦИК крупных размеров появляются при избыточном количестве антител, способны связывать комплемент, не растворимы, легко и быстро фагоцитируются. ЦИК мелких размеров образуются при избыточном количестве антигенов, растворимы и обладают наибольшим патологическим потенциалом, разрушая органы-мишени. У больных МЖ до операции выявлялось увеличение ЦИК крупных и мелких размеров, а после операции отмечалось их снижение.

Обсуждение

По результатам нашего исследования, у больных МЖ, обусловленной холангиокарциномой, выявлялась активация гуморального иммунитета за счет увеличения содержания IgA, IgG, IgE в сыворотке со значительной депрессией некоторых звеньев клеточного иммунитета, что способствовало дисбалансированной работе всей иммунной системы. Дисбаланс системы клеточного звена иммунитета проявлялся уменьшением количества Т-хелперов и увеличением цитотоксических Т-лимфоцитов, снижением индекса соотношения $CD4^+/CD8^+$. Увеличенное количество цитотоксических Т-лимфоцитов указывает на снижение Т-клеточного иммунитета и существовании на клеточном уровне цитотоксического действия. Снижение количества pan-маркеров Т-лимфоцитов указывает на общую сниженную активность Т-клеточного звена

в результате изменения функции Т-клеток, ведущую к нарушению антиген-презентирующей функции клеток иммунной системы. Развитие Т-клеточного иммунодефицита из-за апоптоза Т-лимфоцитов доказывает повышение экспрессии иммуномаркеров $CD38^+$, $CD95^+$. Увеличение сывороточного содержания некоторых иммуноглобулинов указывает на развитие дисбаланса гуморального звена иммунитета, а увеличение ЦИК свидетельствует о выраженной из-за МЖ интоксикации организма за счет гипербилирубинемии и распада опухолевых клеток. Увеличение содержания крупных и мелких ЦИК у больных МЖ до операции указывает на наличие у них иммунодефицитного состояния и на активацию лимфоцитов в результате наличия активных патологических процессов, а также является маркером ухудшения клинического течения заболевания. Изменения в клеточном и гуморальном звеньях иммунитета при злокачественных опухолях [12, 14, 15] сопровождаются изменениями метаболического статуса лимфоцитов [11, 13] и нарушениями в системе ПОЛ-АОЗ [16].

Использование хирургической коррекции МЖ способствовало нормализации показателей клеточного и гуморального звеньев иммунитета. Таким образом, хирургическая терапия МЖ, обусловленной холангиокарциномой, является эффективным способом коррекции иммунного статуса, находящегося в состоянии дисбаланса из-за основного заболевания и развившегося осложнения. Для нормализации показателей адаптивного клеточного и гуморального иммунитета и сохранения возможности использования в дальнейшем дозовой нагрузки при химиотерапии требуется назначение иммунокорригирующего лечения.

Список литературы/References

1. Винник Ю.С., Пахомова Р.А., Кочетова Л.В., Воронова Е.А., Козлов В.В., Кириченко А.А. Предикторы печеночной недостаточности при механической желтухе // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 2018. № 3. С. 37–41. [Vinnik Yu.S., Pakhomova R.A., Kochetova L.V., Voronova E.A., Kozlov V.V., Kirichenko A.A. Predictors of liver failure in obstructive jaundice. *Khirurgiya. Zurnal im. N.I. Pirogova = Pirogov Russian Journal of Surgery, 2018, no. 3, pp. 37–41. (In Russ.)*] *doi: 10.17116/hirurgia2018337-41*
2. Гальперин Э.И., Ахаладзе Г.Г., Ветшев П.С., Дюжева Т.Г. Дифференциальный подход к применению минимально инвазивных методов лечения опухолевой механической желтухи // Анналы хирургической гепатологии. 2019. Т. 24, № 8. С. 10–24. [Galperin E.I., Akhaladze G.G., Vetshev P.S., Dyuzheva T.G. Differential approach to the use of minimally invasive methods of treating neoplastic obstructive jaundice. *Annaly khirurgicheskoy gepatologii = Annals of HPB Surgery, 2019, vol. 24, no. 8, pp. 10–24. (In Russ.)*] *doi: 10.16931/1995-5464.2019210-24*
3. Земсков А.М., Земскова В.М., Земсков М.А., Воронцова З.А., Золоедов В.И. Инновационно-аналитические технологии по итогам традиционного иммунологического мониторинга больных // Вестник новых медицинских технологий. 2019. Т. 26, № 2. С. 40–43. [Zemskov A.M., Zemskova V.M., Zemskov M.A., Vorontsova Z.A., Zoloedov V.I. Innovative and analytical technologies based on the results traditional immunological monitoring of patients. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologii = Journal of New Medical Technologies, 2019, vol. 26. no. 2, pp. 40–43. (In Russ.)*] *doi: 10.24411/1609-2163-2019-16349*
4. Ившин В.Г., Малафеев И.В., Якунин А.Ю., Дьяков М.А., Абдулоев С.М. Чрескожные желчеотводящие вмешательства у больных с механической желтухой в условиях дневного стационара // Вестник новых медицинских технологий. 2018. Т. 25, № 1. С. 5–13. [Ivshin V.G., Malafeev I.V., Yakunin A.Yu., Dyakov M.A., Abduloev S.M. Percutaneous bile diverting interventions in patients with obstructive jaundice in a day hospital. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologii = Journal of New Medical Technologies, 2018, vol. 25, no. 1, pp. 5–13. (In Russ.)*] *doi: 10.24411/1609-2163-2018-15965*
5. Козлов А.В., Поликарпов А.А., Таразов П.Г., Попов В.В., Осмаев А.Э. Стентирование желчных протоков: осложнения при транс- и супрапапиллярном методах чрескожного чреспеченочного эндопротезирования у больных со злокачественной механической желтухой // Диагностическая и интервенционная радиология. 2012. Т. 6, № S2.1. С. 70–71. [Kozlov A.V., Polikarpov A.A., Tarazov P.G., Popov V.V., Osmaev A.E. Bile duct stenting: complications in trans- and suprapapillary methods of percutaneous transhepatic arthroplasty in patients with malignant obstructive jaundice. *Diagnosticheskaya i interventsionnaya radiologiya = Diagnostic and Interventional Radiology, 2012, vol. 6, no. S2.1, pp. 70–71. (In Russ.)*]
6. Котовский А.Е., Глебов К.Г., Дюжева Т.Г., Сюмарева Т.А., Магомедова Б.М. Ретроградное эндопротезирование желчных протоков при доброкачественных заболеваниях органов гепатопанкреатодуоденальной зоны // Анналы хирургической гепатологии. 2019. Т. 24, № 1. С. 61–70. [Kotovsky A.E., Glebov K.G., Dyuzheva T.G., Syumareva T.A., Magomedova B.M. Retrograde bile duct endoprosthetics in benign diseases of the hepatopancreatoduodenal zone. *Annaly khirurgicheskoy gepatologii = Annals of HPB Surgery, 2019, vol. 24, no. 1, pp. 61–70. (In Russ.)*] *doi: 10.16931/1995-5464.2019161-70*
7. Кошевский П.П., Алексеев С.А., Олесюк Б.В., Алексеев В.С. Инфекционные осложнения у пациентов с механической желтухой неопухолевого генеза // Медицинский журнал. 2017. № 2 (60). С. 84–86. [Koshevsky P.P., Alekseev S.A., Olesyuk B.V., Alekseev V.S. Infectious complications in patients with obstructive jaundice of non-neoplastic genesis. *Meditsinskii zhurnal = Medical Journal, 2017, no. 2 (60), pp. 84–86. (In Russ.)*]
8. Кукош М.В., Демченко В.И., Колесников Д.Л., Ветюгов Д.Е. Этапное лечение механической желтухи, вызванной желчнокаменной болезнью // Ульяновский медико-биологический журнал. 2018. № 2. С. 26–31. [Kukosh M.V., Demchenko V.I., Kolesnikov D.L., Vetyugov D.E. Staged treatment of obstructive jaundice caused by cholelithiasis. *Ul'yanovskii mediko-biologicheskii zhurnal = Ulyanovsk Medico-Biological Journal, 2018, no. 2, pp. 26–31. (In Russ.)*] *doi: 10.23648/UMBJ.2018.30.13987*

9. Подолужный В.И. Механическая желтуха: принципы диагностики и современного хирургического лечения // Фундаментальная и клиническая медицина. 2018. № 2. С. 82–92. [Podoluzhny V.I. Obstructive jaundice: principles of diagnosis and modern surgical treatment. *Fundamental'naya i klinicheskaya meditsina = Fundamental and Clinical Medicine, 2018, no. 2, pp. 82–92. (In Russ.)*]
10. Праздников Е.Н., Баранов Г.А., Зинатулин Д.Р., Умяров Р.Х., Шевченко В.П., Николаев Н.М. Возможности антеградного доступа в лечении холангиолитиаза, осложненного синдромом механической желтухи // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 2018. № 1. С. 21–25. [Prazdnikov E.N., Baranov G.A., Zinatulin D.R., Umyarov R.Kh., Shevchenko V.P., Nikolaev N.M. Possibilities of antegrade access in the treatment of cholangiolithiasis complicated by obstructive jaundice syndrome. *Khirurgiya. Zurnal im. N.I. Pirogova = Pirogov Russian Journal of Surgery, 2018, no. 1, pp. 21–25. (In Russ.)*] *doi: 10.17116/hirurgia2018121-25*
11. Смирнова О.В., Манчук В.Т. Особенности клеток иммунной системы при остром лимфобластном лейкозе // Медицинская иммунология. 2013. Т. 15, № 6. С. 577–584. [Smirnova O.V., Manchuk V.T. Features of cells of the immune system in acute lymphoblastic leukemia. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2013, vol. 15, no. 6, pp. 577–584. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/1563-0625-2013-6-577-584*
12. Смирнова О.В., Манчук В.Т., Агилова Ю.Н. Роль неспецифического иммунитета при прогрессировании миеломной болезни // Современные проблемы науки и образования. 2014. № 2. С. 515. [Smirnova O.V., Manchuk V.T., Agilova Yu.N. The role of nonspecific immunity in the progression of myeloma. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science And Education, 2014, no. 2, p. 515. (In Russ.)*]
13. Смирнова О.В., Манчук В.Т., Савченко А.А. Метаболический статус лимфоцитов крови при хроническом миелолейкозе и хроническом лимфолейкозе // Медицинская иммунология. 2008. Т. 10, № 1. С. 21–26. [Smirnova O.V., Manchuk V.T., Savchenko A.A. Metabolic status of blood lymphocytes in chronic myeloid leukemia and chronic lymphocytic leukemia. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2008, vol. 10, no. 1, pp. 21–26. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/1563-0625-2008-1-21-26*
14. Смирнова О.В., Савченко А.А., Манчук В.Т. Хронические лейкозы: клинические и иммунологические особенности возникновения и развития. Новосибирск: Наука, 2012. 127 с. [Smirnova O.V., Savchenko A.A., Manchuk V.T. Chronic leukemia: clinical and immunological features of occurrence and development. *Novosibirsk: Nauka, 2012. 127 p. (In Russ.)*]
15. Смирнова О.В., Савченко А.А., Манчук В.Т., Москов В.И. Особенности клеточного и гуморального иммунитета у больных острыми нелимфобластным и лимфобластным лейкозами // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). 2006. Т. 59, № 1. С. 35–38. [Smirnova O.V., Savchenko A.A., Manchuk V.T., Moskov V.I. Features of cellular and humoral immunity in patients with acute non-lymphoblastic and lymphoblastic leukemia. *Sibirskij medicinskij zhurnal (Irkutsk) = Siberian Medical Journal (Irkutsk), 2006, vol. 59, no. 1, pp. 35–38. (In Russ.)*]
16. Смирнова О.В., Титова Н.М., Елманова Н.Г. Роль прооксидантной системы в прогрессировании миеломной болезни // Врач-аспирант. 2013. Т. 60, № 5.1. С. 152–157. [Smirnova O.V., Titova N.M., Elmanova N.G. The role of the prooxidant system in the progression of myeloma. *Vrach-aspirant = Postgraduate Doctor, 2013, vol. 60, no. 5.1, pp. 152–157. (In Russ.)*]
17. Стяжкина С.Н., Гадельшина А.А., Ворончихина Е.М. Механическая желтуха — основное осложнение гепатопанкреатобилиарной системы // Вестник науки и образования. 2017. № 5 (29). С. 103–105. [Styazhkina S.N., Gadelshina A.A., Voronchikhina E.M. Obstructive jaundice is the main complication of the hepatopancreatobiliary system. *Vestnik nauki i obrazovaniya = Bulletin of Science and Education, 2017, no. 5 (29), pp. 103–105. (In Russ.)*]
18. Тагиев Э.Г. Сравнительная оценка эффективности иммунотерапии ронколейкином у больных с механической желтухой доброкачественной этиологии // Цитокины и воспаление. 2015. Т. 14, № 4. С. 76–81. [Tagiev E.G. Comparative evaluation of the effectiveness of immunotherapy with roncoleukin in patients with obstructive jaundice of benign etiology. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation, 2015, vol. 14, no. 4, pp. 76–81. (In Russ.)*]
19. Хаитов Р.М. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. 716 с. [Khaitov R.M. Immunology. *Moscow: GEOTAR-Media, 2016. 716 p. (In Russ.)*]
20. Abshagen K., König M., Hoppe A., Müller I., Ebert M., Weng H., Holzhütter H.-G., Zanger U.M., Bode J., Vollmar B., Thomas M., Dooley S. Pathobiochemical signatures of cholestatic liver disease in bile duct ligated mice. *BMC Systems Biology, 2015, no. 9: 83. doi: 10.1186/s12918-015-0229-0*
21. Gomi H., Takada T., Hwang T.L., Akazawa K., Mori R., Endo I., Miura F., Kiriyama S., Matsunaga N., Itoi T., Yokoe M., Chen M., Jan Y., Ker C., Wang H., Wada K., Yamaue H., Miyazaki M., Yamamoto M. Updated comprehensive epidemiology, microbiology, and outcomes among patients with acute cholangitis. *J. Hepatobiliary Pancreat Sci., 2017, vol. 24, no. 6, pp. 310–318. doi: 10.1002/jhbp.452*
22. Martinez-Cecília D. Oxidative stress influence on renal dysfunction in patients with obstructive jaundice: a case and control prospective study. *Redox Biology, 2016, no. 8, pp. 160–164. doi: 10.1016/j.redox.2015.12.009*
23. Mayumi T., Okamoto K., Takada T. Strasberg S., Solomkin J., Schlossberg D., Pitt H., Yoshida M., Gomi H., Miura F., Garden O., Kiriyama S., Yokoe M., Endo I., Asbun H., Iwashita Y., Hibi T., Umezawa A., Suzuki K., Takao Itoi T., Hata J., Han H., Hwang T., Dervenis C., Asai K., Mori Y., Huang W., Belli G, Mukai S., Jagannath P., Cherqui D., Kozaka K., Baron T., Santibañes E., Higuchi R., Wada K., Gouma D., Deziel D., Liau K., Wakabayashi G., Padbury R., Jonas E., Supe A., Singh H., Gabata T., Chan A., Lau W., Fan S., Chen M., Ker C., Yoon Y., Choi I., Kim M., Yoon D., Kitano S., Inomata M., Hirata K., Inui K., Sumiyama Y, Yamamoto M. Tokyo Guidelines 2018: Management bundles for acute cholangitis and cholecystitis. *Hepatobiliary Pancreat Sci., 2018, vol. 25, no. 1, pp. 96–100. doi: 10.1002/jhbp.519*
24. Mazuski J.E., Tessier J.M., May A.K., Sawyer R.G., Nadler E.P., Rosengart M.R., Chang P., O'Neill P., Mollen K., Huston J., Diaz J., Prince J. The Surgical Infection Society revised guidelines on the management of intra-abdominal infection. *Surg. Infect. (Larchmt), 2017, vol. 18, no. 1, pp. 1–76. doi: 10.1089/sur.2016.261*
25. Melnick S., Fareedy S., Gish D., Nazir S. Duodenal diverticulum: incidental finding with potentially dangerous outcomes. *J. Community Hosp. Intern. Med. Perspect., 2017, no. 7, pp. 56–57. doi: 10.1080/20009666.2017.1291784*

26. Mendonça E.Q., Bernardo W.M., Moura E.G., Chaves D.M., Kondo A., Pu L.Z., Baracat F.I. Endoscopic versus surgical treatment of ampullary adenomas: a systematic review and meta-analysis. *Clinics (Sao Paulo), 2016, vol. 71, no. 1, pp. 28–35. doi: 10.6061/clinics/2016(01)06*
27. Tsai C.H., Yeh C.H., Sheen Chen S.M., Huang C.Y., Liu Y.W., Huang C.C., Shen S.C., Tang R.P. The kinetic expression of lipopolysaccharide-binding protein and CD14 gene in obstructive jaundice. *J. Invest Surg., 2015, vol. 28, no. 1, pp. 18–23. doi: 10.3109/08941939.2014.943858*
28. Uysal E., Dokur M. The helminths causing surgical or endoscopic abdominal intervention: a review article. *Iran Journal Parasitol., 2017, no. 1, pp. 156–168.*
29. Williams E., Beckingham I., Sayed G., Gurusamy K., Sturgess R., Webster G., Young T. Updated guideline on the management of common bile duct stones (CBDS). *Gut, 2017, vol. 66, no. 5, pp. 765–782. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312317*
30. Yang Z., Zhang Y., Dong L., Yang C., Gou S., Yin T., Wu H., Wang C. The reduction of peripheral blood CD4+ T cell indicates persistent organ failure in acute pancreatitis. *PLoS One, 2015, vol. 10, no. 5: e0125529. doi: 10.1371/journal.pone.0125529*
31. Yokoe M., Hata J., Takada T., Strasberg S.M., Asbun H.J., Wakabayashi G., Kozaka K., Endo I., Deziel D.J., Miura F., Okamoto K., Hwang T.L., Huang W.S., Ker C.G., Chen M.F., Han H.S., Yoon Y.S., Choi I.S., Yoon D.S., Noguchi Y., Shikata S., Ukai T., Higuchi R., Gabata T., Mori Y., Iwashita Y., Hibi T., Jagannath P., Jonas E., Liau K.H., Dervenis C., Gouma D.J., Cherqui D., Belli G., Garden O.J., Giménez M.E., de Santibañes E., Suzuki K., Umezawa A., Supe A.N., Pitt H.A., Singh H., Chan A.C.W., Lau W.Y., Teoh A.Y.B., Honda G., Sugioka A., Asai K., Gomi H., Itoi T., Kiriyama S., Yoshida M., Mayumi T., Matsumura N., Tokumura H., Kitano S., Hirata K., Inui K., Sumiyama Y., Yamamoto M. Tokyo Guidelines 2018: diagnostic criteria and severity grading of acute cholecystitis (with videos). *J. Hepatobiliary Pancreat. Sci., 2018, no. 25, pp. 41–54. doi: 10.1002/jhbp.515*

Авторы:
Смирнова О.В., д.м.н., доцент, зав. лабораторией клинической патофизиологии НИИ медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН, г. Красноярск, Россия;
Губанов Б.Г., младший научный сотрудник лаборатории клинической патофизиологии НИИ медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН, г. Красноярск, Россия;
Каспаров Э.В., д.м.н., профессор, директор НИИ медицинских проблем Севера, зам. директора по научной работе ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН, г. Красноярск, Россия;
Даренская М.А., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории патофизиологии ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;
Колесникова Л.И., д.м.н., академик РАН, профессор, научный руководитель ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;
Колесников С.Н., д.м.н., академик РАН, профессор, главный научный сотрудник ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия.

Authors:
Smirnova O.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head of the Laboratory of Clinical Pathophysiology, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation;
Gubanov B.G., Junior Researcher, Laboratory of Clinical Pathophysiology, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation;
Kasparov E.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Director of the Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Deputy Director for Scientific Work of the Federal Research Center Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation;
Darenskaya M.A., PhD, MD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Pathophysiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;
Kolesnikova L.I., PhD, MD (Medicine), RAS Full Member, Professor, Scientific Supervisor of the Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;
Kolesnikov S.I., PhD, MD (Medicine), RAS Full Member, Professor, Lead Researcher, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 05.04.2021
Принята к печати 03.01.2022

Received 05.04.2021
Accepted 03.01.2022

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2022, vol. 12, no. 2, pp. 331–338

Инфекция и иммунитет
2022, Т. 12, № 2, с. 331–338

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОФЛОРЫ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ НОСА ПРИ РАЗЛИЧНОМ УРОВНЕ АЛЛЕРГИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

А.М. Лазарева, С.В. Смирнова, О.А. Коленчукова

НИИ медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН, г. Красноярск, Россия

Резюме. В современном мире аллергические заболевания дыхательных путей составляют значительную долю всех хронических заболеваний. Ежегодный прирост распространенности аллергического ринита и бронхиальной астмы среди населения всего мира делает актуальными исследования их патогенеза. Изменения слизистой оболочки носа нарушают ее важнейшую функцию — защиту от агрессивных факторов внешней среды — аллергенов и поллютантов. Воспалительные процессы в носовой полости препятствуют нормальной работе слизистой как неспецифического барьера, и облегчают им дальнейшее проникновение в макроорганизм. Цель исследования: дать сравнительную микробиологическую характеристику слизистой оболочки носа больных респираторной аллергией различного генеза и уровня поражения дыхательных путей. Обследованы больные респираторной аллергией от 23 до 51 лет и практически здоровые (n = 120), сопоставимые по полу и возрасту. Изучаемые группы: атопический риносинусит (АР, n = 28), атопическая бронхиальная астма (АБА, n = 28), полипозный риносинусит (ПРС, n = 68), астматическая триада (АТ, n = 28). Диагностика проводилась аллергологом-иммунологом и оториноларингологом. Выделение микроорганизмов проводили на питательных дифференциально-диагностических средах. Посев проводили секторным методом. Среды инкубировали в термостате при температуре 37°С 48 часов. Статистическая обработка выполнена с использованием пакета программ Statistica 7.0. Выборка описана с подсчетом медианы и 25 и 75 перцентилей. Нормальность распределения проверялась методом Колмогорова–Смирнова. Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни. Отмечено доминирование условно-патогенных микроорганизмов при респираторной атопии (АР, АБА) относительно респираторной псевдоатопии (ПРС, АТ). Увеличение численности бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и *Enterococcus* на слизистой оболочке носа характеризует дисбактериоз, акцентируя наибольшую значимость этих семейств в инициации аллергической патологии верхних и нижних дыхательных путей при атопии. Отличительной межгрупповой особенностью является большая концентрация семейства *Enterobacteriaceae* при АР относительно ПРС и микроорганизмов рода *Enterococcus* при АБА относительно АТ. Таким образом, при аллергическом риносинусите и бронхиальной астме, независимо от генеза воспаления, имеет место выраженный дисбактериоз за счет увеличения условно-патогенной микрофлоры на слизистой оболочке носа относительно контроля.

Ключевые слова: *атопический риносинусит, полипозный риносинусит, атопическая бронхиальная астма, астматическая триада, микробиоценоз, слизистая оболочка носа.*

Адрес для переписки:
Лазарева Анна Михайловна
660022, Россия, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3г, НИИ медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН.
Тел.: 8 391 228-06-83. E-mail: nuraaa@rambler.ru

Contacts:
Anna M. Lazareva
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk, Partizana Zheleznyaka str., 3g, Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences.
Phone: +7 391 228-06-83. E-mail: nuraaa@rambler.ru

Для цитирования:
Лазарева А.М., Смирнова С.В., Коленчукова О.А. Сравнительная характеристика микрофлоры слизистой оболочки носа при различном уровне аллергического воспаления дыхательных путей // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 2. С. 331–338. doi: 10.15789/2220-7619-CCO-1677

Citation:
Lazareva A.M., Smirnova S.V., Kolenchukova O.A. Comparative characteristics of the nasal mucosa microflora at different level of allergic inflammation in the respiratory tract // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 2, pp. 331–338. doi: 10.15789/2220-7619-CCO-1677

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-CCO-1677

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE NASAL MUCOSA MICROFLORA AT DIFFERENT LEVEL OF ALLERGIC INFLAMMATION IN THE RESPIRATORY TRACT

Lazareva A.M., Smirnova S.V., Kolenchukova O.A.

Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. In the modern world, allergic respiratory diseases hold a huge place among all chronic diseases. The annual increase in the prevalence of allergic rhinitis and bronchial asthma among the global population makes relevant studies underlying their pathogenesis. Changes in the nasal mucosa alter its most important function — protection from aggressive environmental factors — allergens and pollutants. Inflammatory processes in the nasal cavity interfere with the normal mucosa functioning as a non-specific barrier, and facilitate their further penetration into the macroorganism. Objective of the study is to provide a comparative microbiological characteristic of the nasal mucosa of patients with respiratory allergies of various origin and level of respiratory tract damage. Patients with respiratory allergies aged 23 to 51 years old as well as sex- and age-matched apparently healthy subjects (n = 120) were examined. The study groups were as follows: atopic rhinosinusitis (AR, n = 28), atopic bronchial asthma (ABA, n = 28), polyposis rhinosinusitis (PRS, n = 68), and asthmatic triad (AT, n = 28). Diagnostics were carried out by an allergist-immunologist as well as an otorhinolaryngologist. Isolation of microorganisms was carried out by placing them on nutrient differential diagnostic media. Seeding was carried out by using the sector method. The culture media were incubated in a thermostat at 37°C for 48 hours. Statistical processing was performed using the Statistica 7.0 software package. The study sample is described by calculating median as well as 25 and 75 percentiles. The normality distribution was checked by using the Kolmogorov–Smirnov method. The significance of differences between parameters of independent samples was assessed by using the nonparametric Mann–Whitney test. Dominance of opportunistic microorganisms in respiratory atopy (AR, ABA) relative to respiratory pseudoatopia (PRS, AT) was noted. The increased number of bacteria from the family *Enterobacteriaceae* and *Enterococcus* on the nasal mucosa characterizes dysbacteriosis, emphasizing the greatest importance of these families in the initiation of allergic pathology in the upper and lower respiratory tract during atopy. A distinctive intergroup feature is a high concentration of the *Enterobacteriaceae* family members in AR vs. PRS as well as microorganisms of the genus *Enterococcus* in ABA vs. AT. Thus, regardless of the cause of inflammation, allergic rhinosinusitis and bronchial asthma were featured with a pronounced dysbacteriosis due to rise in the opportunistic microflora on the nasal mucosa compared to the control group.

Key words: *atopic rhinosinusitis, polypous rhinosinusitis, atopic bronchial asthma, asthmatic triad, microbiocenosis, nasal mucous membrane.*

Введение

В настоящее время аллергические заболевания органов дыхания занимают обширную нишу среди хронических заболеваний. Самыми распространенными вариантами респираторной аллергии являются аллергический риносинусит и бронхиальная астма [19, 23]. Ежегодный стремительный рост их распространенности делает актуальными исследования их этиологии и патогенеза. Проведенные ранее исследования свидетельствуют о гетерогенности респираторных проявлений аллергии, однако важно понимать, что есть как общие, так различные звенья их патогенеза [1]. Фенотипические проявления клинико-патогенетических вариантов респираторной аллергии являются результатом повреждающего действия медиаторов воспаления, выброс которых опосредован различными механизмами (атопическими и псевдоатопическими). Фактор, инициирующий выброс вазоактивных субстанций, определяет разновидность аллергических реакций. Для атопии характерно участие специфических реагинов, чаще иммуноглобулинов Е. Термин псевдоатопия указывает на то, что в качестве триггера аллергической реакции выступают факторы, которые, минуя стадию сенсибилизации, ведут к образованию и выбросу вазоактивных веществ [1]. Классическим проявлением респираторной псевдоатопии является астматическая триада (АТ): полипозный риносинусит (ПРС), непереносимость ненаркотических анальгетиков и нестероидных противовоспалительных препаратов, инициирующих липоксигеназный путь метаболизма арахидоновой кислоты с образованием лейкотриенов, обладающих выраженным бронхоконстрикторным эффектом, с формированием бронхиальной астмы.

Слизистая оболочка полости носа является физиологическим барьером на пути проникновения различных аэрогенных факторов окружающей среды. Для нее характерен определенный состав микробиоты, который достаточно стабилен. Воспалительный процесс в области верхних отделов дыхательных путей развивается при воздействии вирулентного возбудителя и несостоятельности местных и общих защитных ресурсов организма. Результаты научных исследований содержат информацию о весьма скудном представительстве микроорганизмов начального отдела респираторного тракта, участвующих в формировании бактериальных ассоциаций [7]. Воспалительные процессы в носовой полости нарушают неспецифический барьер на пути проникновения аллергенов

и других поллютантов. Изменения микробиома можно рассматривать как индикатор дисбиоза респираторного тракта.

Цель настоящего исследования — дать сравнительную микробиологическую характеристику слизистой оболочки носа больных респираторной аллергией различного генеза и уровня поражения дыхательных путей.

Материалы и методы

Обследованы больные респираторной аллергией в возрасте от 23 до 51 года (средний возраст — 22,6±2,1 лет) и практически здоровые добровольцы (n = 120), идентичные по полу и возрасту. В структуре патологии выделены: респираторная атопия, включающая в себя атопический риносинусит (АР, n = 28) и атопическую бронхиальную астму (АБА, n = 28), и респираторная псевдоатопия, включающая в себя ПРС (n = 68) и АТ (n = 28). Диагностика заболеваний проводилась при комплексной работе аллерголога-иммунолога и оториноларинголога. Были использованы стандартные общеклинические методы и методы специфической аллергологической диагностики (аллергологический анамнез, prick-тестирование с неинфекционными аллергенами, определение уровней общего и специфических иммуноглобулинов Е в сыворотке крови методом ИФА).

Дизайн исследования: на первом этапе исследовали микробиом слизистой оболочки носа; на втором этапе изучили видовой состав бактерий рода *Staphylococcus*; на третьем этапе проведена сравнительная характеристика микрофлоры слизистой оболочки носа в зависимости от генеза респираторной аллергии и уровня поражения респираторного тракта.

При взятии образцов материала для исследования микробиома слизистой оболочки носа использовались стерильные тупферы с коммерческой транспортной средой Эймса. Выделение микроорганизмов проводили на питательных дифференциально-диагностических средах: желточно-солевом агаре (ЖСА), агаре Эндо и энтерококк-агаре. В качестве основы ЖСА использовали элективный солевой агар. По прописи готовили 1,8–2% агар, pH 7,2–7,4. К расплавленному и охлажденному до 45–50°С агару, соблюдая правила асептики, добавляли 20% щелочной взвеси (асептически извлеченный из яйца желток взбалтывали с 200 мл изотонического раствора хлорида натрия), смешивали тщательно агар с желточной взвесью, разливали по 20 мл в чашки Петри. Посев проводили секторным методом: чашку делили на 4 сектора; в первом секторе делали площадку с ватного тампона и рассеивали четырьмя штрихами во второй сектор; прожигали петлю и рассеивали четырьмя штрихами в третий сектор; прожигали петлю и рассеивали четырьмя штрихами в четвертый сектор. Засеянные среды инкубировали в термостате при температуре 37°С в течение 24 часов. Подсчет микроорганизмов проводили по расчетной таблице. Выросшие изоляты пересевали на скошенный мясопептонный агар и питательный полужидкий агар (0,4%) для получения чистых культур и изучения признаков, используемых при идентификации. О чистоте культуры судили с помощью визуального и микроскопического контроля.

Статистическая обработка результатов исследования выполнена с применением пакета прикладных программ Statistica 10.0. Изучаемая выборка описана с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей (C_{25} и C_{75}). Нормальность распределения подтверждена методом Колмогорова–Смирнова. Статистически значимые различия между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез меньше или равен 0,05.

Результаты

На первом этапе был изучен видовой состав микрофлоры слизистой оболочки носа при риносинуситах различного генеза (АР и ПРС): *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus haemolyticus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* (табл. 1).

При АР показатель содержания условно-патогенных микроорганизмов находилось в пределах референсных интервалов, за исключением *Haemophilus influenzae*, количество которых статистически значимо выше, чем в группе контроля. Кроме того, в группе больных АР на слизистой оболочке носа обнаружены бактерии *Streptococcus haemolyticus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, которые не выявлены в группе контроля.

При ПРС содержание КОЕ *Streptococcus pneumoniae* статистически значимо выше по сравнению с группой контроля. При этом такие возбудители, как *Haemophilus influenzae*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, которые были обнаружены при АР, при ПРС, как и в группе контроля, отсутствовали (табл. 1).

На втором этапе изучили видовой состав бактерий рода *Staphylococcus*, выделенных со слизистой оболочки носа при АР и ПРС (табл. 2). Показана статистически значимо высокая численность штаммов *Staphylococcus aureus*, относящихся к коагулазопозитивным стафилококкам, в группе АР по сравнению с группой контроля (табл. 2). При этом частота встречаемости и ко-

Таблица 1. Показатели видового состава микрофлоры слизистой оболочки носа при атопическом и полипозном риносинусите, Me (C_{25}–C_{75})

Table 1. Indicators of the species composition of the microflora of the nasal mucosa with atopic and polypoid rhinosinusitis, Me (C_{25}–C_{75})

Показатели, КОЕ/мл Parameters, CFU/ml	**Контроль** Control	**АР** AR	**ПРС** PRS
	1 **N = 209**	**2** **N = 28**	**3** **N = 68**
S. pneumoniae	1000 (0–1000)	8000 (100–2500)	2 500 000 (10 000–3 000 000) P_1 = 0,012
S. haemolyticus	0	1500 (1000–2000) P_1 < 0,001	10 000 (1000–15 000)
E. faecium	0	1000 (10–5005) P_1 < 0,001	0
E. faecalis	0	1000 (10–10 000) P_1 < 0,001	0
M. catarrhalis	1000 (0–1000)	10 000 (100–15 000)	15 000 (1000–42 000)
H. influenzae	0	280 000 (1200–300 000) P_1 < 0,001	0

Примечание. Статистически достоверные различия: P_1 — с группой контроля.
Note. Statistically significant differences: P_1 — vs. control group.

личество коагулазонегативных стафилококков статистически значимо достоверно выше относительно группы контроля. Выявлено большое видовое разнообразие микроорганизмов, относящихся к роду *Staphylococcus*: *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. cohnii*, *S. capitis*, *S. hyicus*. Представляет интерес наличие на слизистой оболочке носа *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. cohnii*, *S. capitis*, *S. hyicus* при АР, тогда как в группе ПРС обнаруживаются *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. capitis*. В группе контроля штаммов таких видов, как *S. capitis* и *S. hyicus*, не выявлено.

На третьем этапе определен состав микроорганизмов рода *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Enterobacteriaceae* и дана сравнительная характеристика микрофлоры слизистой оболочки носа больных респираторной аллергией различного генеза и уровня поражения респираторного тракта (табл. 3).

Особенностями изменения состава условно-патогенной микрофлоры при риносинуситах, независимо от генеза аллергического воспаления, установлено статистически значимо высокое содержание общей микробной флоры в группе АР и ПРС относительно группы контроля,

Таблица 2. Показатели видового состава бактерий рода *Staphylococcus*, выделенных со слизистой носа при атопическом и полипозном риносинусите, Me (C_{25}–C_{75})

Table 2. Parameters of the genus *Staphylococcus* species composition isolated from the nasal mucosa with atopic and polypous rhinosinusitis, Me (C_{25}–C_{75})

Показатели, КОЕ/мл Parameters, CFU/ml	**Контроль** Control	**АР** AR	**ПРС** PRS
	1 **N = 209**	**2** **N = 28**	**3** **N = 68**
S. aureus	200 (0–200)	15 500 (40–17 000) P_1 < 0,001	52 550 (100–500 000)
S. epidermidis	1000 (100–100 000)	10 000 (1000–10 000) P_1 < 0,001	5000 (1000–100 000) P_1 = 0,021
S. haemolyticus	100 (10–100)	10 000 (100–100 000) P_1 = 0,039	55 000 (7500–2 550 000) P_1 = 0,023
S. hominis	5505 (100–11 000)	300 (90–10 000) P_1 = 0,029	750 000 (500 000–1 000 000) P_2 = 0,029
S. cohnii	10 000 (10 000–10 000)	10 000 (1000–100 000)	0
S. capitis	0	10 000 (5500–205 000)	1000 (1000–1000)
S. hyicus	0	5500 (1000–10 000)	0

Примечание. Статистически достоверные различия: P_1 — с группой контроля, P_2 — с группой АР.
Note. Statistically significant differences: P_1 — vs. control group, P_2 — vs. AR group.

Таблица 3. Состав микрофлоры слизистой оболочки носа при различном генезе аллергического воспаления и уровне поражения респираторного тракта, Me (C_{25}–C_{75})

Table 3. The microbial composition of the nasal mucosa with different genesis of allergic inflammation and level of respiratory tract damage, Me (C_{25}–C_{75})

Показатели, КОЕ/мл Parameters, CFU/ml	**Контроль** Control	**ПРС** PRS	**АТ** AT	**АР** AR	**АБА** ABA
	1 **N = 209**	**2** **N = 68**	**3** **N = 28**	**4** **N = 28**	**5** **N = 28**
***Staphylococcus* spp.**	10 000 (1000–10 110)	516 000 (20 000–863 000) $P_1 < 0,001$	1 000 000 (500 000–50 000 000) $P_1 < 0,001$	100 000 (52 500–25 050 000) $P_1 = 0,05$	5 000 000 (1 000 000–100 000 000) $P_1 < 0,001$
***Streptococcus* spp.**	1000 (550–1000)	1 000 000 (500 000–8 000 000) $P_1 < 0,001$	500 000 (50 000–50 000 000) $P_1 < 0,001$	50 050 000 (100 000–100 000 000) $P_1 = 0,03$	100 000 000 (10 000 000–500 000 000) $P_1 < 0,001$
***Enterococcus* spp.**	0 (0–0)	0(0–0)	1000 (1000–1000) $P_{1,2} < 0,001$	5050 (100–10 000) $P_{1,2} < 0,001$	50 000 (10 000–500 000) $P_{1,2,3} < 0,001$
***Enterobacteriaceae* spp.**	1000 (100–10 000)	100 000 (100 000–100 000) $P_1 < 0,001$	10 000 (1000–500 000)	27 500 000 (5 000 000–50 000 000) $P_{1,2} = 0,02$	27 500 000 (1 000 000–50 000 000) $P_1 < 0,001$
Общее количество Total amount	15 780 (1000–20 800)	2 183 250 (1 046 600–6 148 500) $P_1 < 0,001$	2 104 000 (1 011 000–100 000 000) $P_1 < 0,001$	102 605 050 (5 200 100–200 010 000) $P_1 = 0,02$	278 006 000 (105 001 000–51 100 000) $P_1 < 0,001$

Примечание. Статистически достоверные различия: P_1 — с группой контроля, P_2 — с группой ПРС, P_3 — с группой АТ, P_4 — с группой АР.
Note. Statistically significant differences: P_1 — vs. control group, P_2 — vs. PRS group, P_3 — vs. AT group, P_4 — vs. AR group.

превышающее 10^6 КОЕ/мл. В частности, при АР и ПРС было обнаружено статистически значимо высокое содержание микроорганизмов, принадлежащих к родам *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Enterobacteriaceae* (превышает 10^3), по сравнению с группой контроля.

При бронхиальной астме, независимо от генеза аллергического воспаления, установлено статистически значимо высокое содержание общей микробной флоры, превышающее 10^6 КОЕ/мл. Определено статистически значимое высокое содержание микроорганизмов рода *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Enterococcus* при АБА и АТ на слизистой оболочке носа относительно группы контроля. При этом в группе АБА концентрация семейства *Enterococcus* статистически значимо выше, чем в группе АТ.

Общей особенностью микробного пейзажа слизистой оболочки носа при респираторной атопии, независимо от уровня аллергического воспаления респираторного тракта (АР и АБА), является статистически значимо высокое содержание всех исследуемых микроорганизмов *(Staphylococcus, Streptococcus, Enterococcus, Enterobacteriaceae)* и, соответственно, общего количества микробной флоры относительно группы контроля.

При респираторной псевдоатопии, независимо от уровня поражения респираторного тракта, определена статистически значимо высокая концентрация *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. и общего количества микробной флоры относительно группы контроля.

При ПРС определено статистически значимо высокое содержание микроорганизмов рода *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. и *Enterobacteriaceae* spp. относительно группы контроля. Микроорганизмов рода *Enterococcus* при ПРС, как и в группе контроля, не обнаружено, тогда как при АТ на слизистой оболочке носа их концентрация статистически значимо выше, чем в группе контроля.

В группе больных АТ определена статистически значимо высокая концентрация *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp. относительно группы контроля.

Обсуждение

Проведенное нами исследование выявило качественные и количественные изменения состава назальной микробиоты при различных клинико-патогенетических вариантах респираторной аллергии. Факты дисбиоза слизистой оболочки носа при аллергических заболеваниях респираторного тракта встречаются и в литературе. При этом результаты достаточно противоречивы, есть данные как об увеличении, так и об уменьшении количества условно-патогенной микрофлоры [2, 9, 16].

В настоящем исследовании продемонстрированы как общие, так и специфические изменения состава микробной флоры слизистой оболочки носа в зависимости от генеза аллергического воспаления и уровня поражения респираторного тракта.

Так, общей особенностью дисбиоза при аллергических риносинуситах, независимо от генеза воспаления (АР и ПРС), является наличие микроорганизмов рода *Staphylococcus*, таких как *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*. Состав микроорганизмов, обитающих на слизистой оболочке носа, уже при минимальных отклонениях может являться маркером дисбиотических изменений. Изучение других родов микроорганизмов установило статистически значимо высокое содержание *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Enterobacteriaceae* (превышает 10^3) при АР и ПРС по сравнению с группой контроля.

Для бронхиальной астмы, независимо от генеза аллергического воспаления, определено статистически значимо высокое содержание микроорганизмов рода *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Enterococcus* относительно группы контроля.

Таким образом, специфичным для респираторной атопии является численное преобладание всех изучаемых микроорганизмов относительно группы контроля. Эти результаты совпадают с большим количеством исследований, описывающих важную роль дисбиоза слизистой оболочки носа в патогенезе аллергических заболеваний [3, 12, 17, 18, 22]. Дисбиоз дыхательных путей может быть как следствием напряженного иммунитета, так и вероятным фактом бактериальной сенсибилизации. Изученные нами микроорганизмы относятся к условно-патогенной микрофлоре, поэтому увеличение их численности является дисбиотическим изменением слизистой оболочки носа и может быть следствием нарушения как системного, так и местного иммунитета.

При псевдоатопии, независимо от уровня поражения респираторного тракта (ПРС и АТ), обнаружен дисбиоз вследствие высокой концентрации микроорганизмов *Staphylococcus*, *Streptococcus* и общего количества микробной флоры по сравнению с группой контроля. Отличительной особенностью при респираторной псевдоатопии стало более высокое содержание *Enterococcus* при АТ, чем при ПРС. Есть факты, свидетельствующие о мукозальном дисбактериозе: увеличение количества условно-патогенной микрофлоры при ПРС, в частности повышение концентрации семейств *Staphylococcus* и *Streptococcus* [4, 11, 21, 24].

Проведенная нами сравнительная микробиологическая характеристика слизистой оболочки носа при различных клинико-патогенетических вариантах респираторной аллергии показала численное преобладание условно-патогенной микрофлоры при АР по сравнению с ПРС и группой контроля.

При АР на слизистой оболочке носа наблюдается выраженное увеличение содержания изучаемой микрофлоры по сравнению с ПРС. При этом в группе ПРС, несмотря на обеднение видового состава бактерий рода *Staphylococcus*, концентрация штаммов *S. hominis* была значительно выше по сравнению с таковой в группе АР (табл. 2).

При бронхиальной астме, в зависимости от генеза аллергического воспаления, также определены характерные особенности. Микроорганизмы рода *Enterococcus* при АБА обнаруживаются статистически значимо чаще, чем при АТ. Согласно данным литературы, эти бактерии обладают сенсибилизирующей активностью и могут инициировать аллергическое воспаление [5, 14].

При АР значительно увеличено количество условно-патогенной микрофлоры по сравнению с группой контроля. По данным литературы, семейство *Enterobacteriaceae* относят к микроорганизмам с нерегулярным присутствием в носовой полости [25].

В группе ПРС показано нарушение микробного пейзажа слизистой оболочки носа за счет возрастания КОЕ бактерий семейства *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Enterobacteriaceae*, а также общего числа микробной флоры. Вышеуказанные микроорганизмы являются представителями нормофлоры слизистой оболочки носа, но их суммарное количество не должно превышать 10^3 КОЕ/мл. В литературе есть информация об увеличении количества условно-патогенной микрофлоры при ПРС, в частности о повышении концентрации семейств *Staphylococcus* и *Streptococcus* [6, 8, 10, 13].

При АТ определено увеличение содержания бактерий семейства *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Enterobacteriaceae* и общего количества микробной флоры.

Значимое увеличение содержания всех исследуемых бактерий по сравнению с группой контроля при АБА согласуется с мнением ученых о выраженных дисбактериозах при атопических заболеваниях [15, 20]. Интересен тот факт, что количество бактерий рода *Enterococcus* при АБА статистически значимо выше, чем во всех исследуемых группах, включая группу контроля.

Проведенная нами сравнительная микробиологическая характеристика аллергических заболеваний респираторного тракта показала, что при АБА отмечаются наиболее выраженные изменения назальной микробиоты.

В группе ПРС и АТ общее количество микробной флоры составляет более 10^6 КОЕ/мл, а в группах псевдоатопии превышает 10^8 КОЕ/

мл. Однако общее количество микробной флоры статистически значимо выше при АТ и АБА по сравнению с риносинуситом соответствующей этиологии. Увеличение количества условно-патогенных микроорганизмов может свидетельствовать о более выраженных иммунологических изменениях при атопии (АР, АБА) в отличие от псевдоатопии (ПРС, АТ).

Таким образом, при атопии установлено преобладание условно-патогенных микроорганизмов по сравнению с псевдоатопией.

Полученные нами результаты исследования можно расценить как явления дисбактериоза, наступившего вследствие снижения местного и системного иммунитета из-за трофических нарушений слизистой оболочки носа. Микробный пейзаж слизистой оболочки носа в норме скуднее, чем пейзаж зева, поэтому любые, даже минимальные отклонения могут быть признаком дисбиоза, влекущим более серьезные проблемы со стороны макроорганизма [27].

Итак, при респираторной атопии (АР и АБА) определено доминирование условно-патогенных микроорганизмов по сравнению с респираторной псевдоатопией (ПРС и АТ). При АР показано более высокое содержание семейства *Enterobacteriaceae* и *Enterococcus* и низкое количество *Staphylococcus hominis*, чем при ПРС. При АБА увеличена концентрация *Enterococcus* в отличие от АТ и АР. Увеличение численности бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и *Enterococcus* на слизистой оболочке носа характеризует дисбактериоз, акцентируя важную роль этих семейств в запуске аллергического воспаления респираторного тракта атопического генеза. Отличительной межгрупповой особенностью изученных нами клинико-патогенетических вариантов респираторной аллергии является большая концентрация семейства *Enterobacteriaceae* при АР по сравнению с ПРС и микроорганизмов рода *Enterococcus* в группе АБА по сравнению с группой АТ. Таким образом, можно сделать вывод, что при аллергическом риносинусите (АР, ПРС) и бронхиальной астме (АБА, АТ) имеет место выраженный дисбактериоз за счет увеличения условно-патогенной флоры на слизистой оболочке носа по сравнению с группой контроля.

Список литературы/References

1. Адо А.Д. Общая аллергология. М.: Медицина, 1978. 620 с. [Ado A.D. General allergology. *Moscow: Medicine, 1978. 620 p. (In Russ.)*]
2. Батуро А.П., Романенко Э.Е., Леонова А.Ю., Ярцева А.С., Савлевич Е.Л., Мокроносова М.А. Доминирование staphylococcus aureus в микробиоценозе полости носа у детей и взрослых с инфекционным и аллергическим ринитом // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2015. № 1. С. 72–74. [Baturo A.P., Romanenko E.E., Leonova A.Y., Yartseva A.S., Savlevich E.L., Mokronosova M.A. The dominance of staphylococcus aureus in the microbiocenosis of the nasal cavity in children and adults with infectious and allergic rhinitis. *Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 2015, no. 1, pp. 72–74. (In Russ.)*]
3. Винникова Н.В. Особенности микрофлоры полости носа больных полипозным риносинуситом // Российская ринология. 2015. Т. 23, № 1. С. 13–15. [Vinnikova N.V. Features of the microflora of the nasal cavity of patients with polypous rhinosinusitis. *Rossiyskaya rinologiya = Russian Rhinology, 2015, vol. 23, no. 1, pp. 13–15. (In Russ.)*]
4. Добрецов К.Г., Макаревич С.В. Роль стафилококков в развитии хронического полипозного риносинусита // Российская ринология. 2017. Т. 25, № 1. С. 36–40. [Dobretsov K.G., Makarevich S.V. The role of staphylococci in the development of chronic polypous rhinosinusitis. *Rossiyskaya rinologiya = Russian Rhinology, 2017, vol. 25, no. 1, pp. 36–40. (In Russ.)*]
5. Захарова И.Н., Касьянова А.Н., Климов Л.П., Курьянинова В.А., Симакова М.А., Дедикова О.В., Кольцов К.А. Микробиом респираторного тракта: что известно сегодня? // Педиатрия. Приложение к журналу Consilium Medicum. 2018. Т. 4. С. 10–17. [Zakharova I.N., Kasyanova A.N., Klimov L.P., Kuryaninova V.A., Simakova M.A., Dedikova O.V., Koltsov K.A. Microbiome of the respiratory tract: what is known today? *Pediatriya. Prilozhenie k zhurnalu Consilium Medicum = Pediatrics. Annex to Consilium Medicum, 2018, vol. 4, pp. 10–17. (In Russ.)*] *doi: 10.26442/24138460.2018.4.180129*
6. Коленчукова О.А., Смирнова С.В., Савченко А.А. Микробиоценоз слизистой оболочки носа и риносинуситы. Красноярск: Издательство КрасГМУ, 2011. 220 с. [Kolenchukova O.A., Smirnova S.V., Savchenko A.A. Microbiocenosis of the nasal mucosa and rhinosinusitis. *Krasnoyarsk: Publishing House of Krasnoyarsk State Medical University, 2011. 220 p. (In Russ.)*]
7. Мельник А.М., Воронов А.В., Дворянчиков В.В., Исаченко В.С., Ачба Р.Р. Состояние микрофлоры полости носа при полипозном риносинусите // Российская оториноларингология. 2017. Т. 1, № 86. С. 73–82. [Melnik A.M., Voronov A.V., Dvoryanchikov V.V., Isachenko V.S., Achba R.R. The state of the microflora of the nasal cavity with polypous rhinosinusitis. *Rossiiskaya otorinolaringologiya = Russian Otorhinolaryngology, 2017, vol. 1, no. 86, pp. 73–82. (In Russ.)*]
8. Пухаева М.О., Галуева З.Р., Михайлиди Е.Ф. Микробный биоценоз при аллергическом рините у детей // Альманах мировой науки. 2017. Т. 5, № 20. С. 21–22. [Pukhaev M.O., Galueva Z.R., Mikhailidi E.F. Microbial biocenosis in allergic rhinitis in children. *Almanakh mirovoy nauki = Almanac of Science Global, 2017, vol. 5, no. 20, pp. 21–22. (In Russ.)*]
9. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / Под ред. М.О. Биргера. М.: Медицина, 1982. 159 с. [Handbook of microbiological and virological research methods. Ed. by M.O. Birger. *Moscow: Medicine, 1982. 159 p. (In Russ.)*]
10. Темникова И.В., Онучина Е.В., Субботина М.В. Мукоцилиарный транспорт и микробиота полости носа, околоносовых пазух при хроническом риносинусите, ассоциированном с гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. 2016. Т. 1, № 3 (109). С. 78–81. [Temnikova I.V., Onuchina E.V., Subbotina M.V. Mucociliary transport and microbiota of the nasal cavity, paranasal sinuses in chronic rhinosinusitis associated with gastroesophageal reflux disease. *Bulleten Vostochno-*

Sibirskogo nauchnogo centra Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Bulletin of the East Siberian Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, 2016, vol. 1, no. 3 (109), pp. 78–81. (In Russ.)]

11. Федосеев Г.Б., Трофимов В.И., Голубева В.И., Тимчик В.Г., Негруца К.В., Разумовская Т.С., Александрин В.А., Крякунов К.Н. К вопросу о роли бактерий у больных бронхиальной астмой, хронической обструктивной болезнью легких // Российский аллергологический журнал. 2018. Т. 15, № 6. С. 65–78. [Fedoseev G.B., Trofimov V.I., Golubeva V.I., Timchik V.G., Negrutsa K.V., Razumovskaya T.S., Aleksandrin V.A., Kryakunov K.N. To the question of the role of bacteria in patients with bronchial asthma, chronic obstructive pulmonary disease. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Allergological Journal, 2018, vol. 15, no. 6, pp. 65–78. (In Russ.)*]
12. Федосенко С.В., Огородова Л.М., Карнаушкина М.А., Куликов Е.С., Деев И.А., Кириллова Н.А. Роль сообщества микроорганизмов дыхательных путей в патогенезе хронической обструктивной болезни легких // Бюллетень сибирской медицины. 2014. Т. 13, № 1. С. 153–160. [Fedosenko S.V., Ogorodova L.M., Karnaushkina M.A., Kulikov E.S., Deev I.A., Kirillova N.A. The role of the community of microorganisms of the respiratory tract in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Biulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine, 2014, vol. 13, no. 1, pp. 153–160. (In Russ.)*]
13. Anderson M., Stokken J., Sanford T., Aurora R., Sindwani R. A systematic review of the sinonasal microbiome in chronic rhinosinusitis. *Am. J. Rhinol. Allergy, 2016, vol. 30, no. 3, pp. 161–166. doi: 10.2500/ajra.2016.30.4320*
14. Carr T.F., Alkatib R., Kraft M. Microbiome in mechanisms of asthma. *Clin. Chest Med., 2019, vol. 40, no. 1, pp. 87–96. doi: 10.1016/j.ccm.2018.10.006*
15. Chalermwatanachai T., Velásquez L.C., Bachert C. The microbiome of the upper airways: focus on chronic rhinosinusitis. *World Allergy Organ J., 2015, vol. 8, no. 1: 3. doi: 10.1186/s40413-014-0048-6*
16. Durack J., Lynch S.V., Nariya S., Bhakta N.R., Beigelman A., Castro M., Dyer A.M., Israel E., Kraft M., Martin R.J., Mauger D.T., Rosenberg S.R., Sharp-King T., White S.R., Woodruff P.G., Avila P.C., Denlinger L.C., Holguin F., Lazarus S.C., Lugogo N., Moore W.C., Peters S.P., Que L., Smith L.J., Sorkness C.A., Wechsler M.E., Wenzel S.E., Boushey H.A., Huang Y.J.; National Heart, Lung and Blood Institute's "AsthmaNet". Features of the bronchial bacterial microbiome associated with atopy, asthma, and responsiveness to inhaled corticosteroid treatment. *J. Allergy Clin. Immunol., 2017, vol. 140, no. 1, pp. 63–75. doi: 10.1016/j.jaci.2016.08.055*
17. Fazlollahi M., Lee T.D., Andrade J., Oguntuyo K., Chun Y., Grishina G., Grishin A., Bunyavanich S. The nasal microbiome in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol., 2018, vol. 142, no. 3, pp. 834–843. doi: 10.1016/j.jaci.2018.02.020*
18. Frati F., Salvatori C., Incorvaia C., Bellucci A., Di Cara G., Marcucci F., Esposito S. The Role of the microbiome in asthma: the gut–lung axis. *Int. J. Mol. Sci., 2018, vol. 20, no. 1: 123. doi: 10.3390/ijms20010123*
19. Giavina-Bianchi P., Aun M.V., Takejima P., Kalil J., Agondi R.C. United airway disease: current perspectives. *J. Asthma Allergy, 2016, vol. 9, pp. 93–100. doi: 10.2147/JAA.S81541*
20. Holgate S.T. The airway epithelium is central to the pathogenesis of asthma. *Allergol. Int., 2008, vol. 57, no. 1, pp. 1–10.*
21. Huang Y.J., Nariya S., Harris J.M., Lynch S.V., Choy D.F., Arron J.R., Boushey H. The airway microbiome in patients with severe asthma: associations with disease features and severity. *J. Allergy Clin. Immunol., 2015, vol. 136, pp. 874–884.*
22. Jason L.P., Galeb A.A., Curtis H. The healthy human microbiome. *Genome Med., 2016, vol. 8: 51. doi: 10.1186/s13073-016-0307-y*
23. Lambrecht B.N., Hammad H. The immunology of the allergy epidemic and the hygiene hypothesis. *Nat. Immunol., 2017, vol. 18, no. 10, pp. 1076–1083. doi: 10.1038/ni.3829*
24. Marsh R.L., Nelson M.T., Pope C.E., Leach A.J., Hoffman L.R., Chang A.B., Smith-Vaughan H.C. How low can we go? The implications of low bacterial load in respiratory microbiota studies. *Pneumonia (Nathan), 2018, vol. 10: 7. doi: 10.1186/s41479-018-0051-8*
25. Mitchell A.B., Glanville A.R. The human respiratory microbiome: implications and impact. *Semin. Respir. Crit. Care Med., 2018, vol. 39, no. 2, pp. 199–212. doi: 10.1055/s-0037-1617441*
26. Salzano F.A., Marino L., Salzano G., Botta R.M., Cascone G., D'Agostino Fiorenza U., Selleri C., Casolaro V. Microbiota composition and the integration of exogenous and endogenous signals in reactive nasal inflammation. *J. Immunol. Res., 2018, vol. 2018: 2724951. doi: 10.1155/2018/2724951*
27. Teo S.M., Mok D., Pham K., Kusel M., Serralha M., Troy N., Holt B.J., Hales B.J., Walker M.L., Hollams E., Bochkov Y.A., Grindle K., Johnston S.L., Gern J.E., Sly P.D., Holt P.G., Holt K.E., Inouye M. The infant nasopharyngeal microbiome impacts severity of lower respiratory infection and risk of asthma development. *Cell Host Microbe, 2015, vol. 17, no. 5, pp. 704–715. doi: 10.1016/j.chom.2015.03.008*

Авторы:

Лазарева А.М., к.м.н., младший научный сотрудник лаборатории клинической патофизиологии НИИ медицинских проблем Севера — обособленного подразделения ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН, г. Красноярск, Россия;

Смирнова С.В., д.м.н., профессор, руководитель научного направления НИИ медицинских проблем Севера — обособленного подразделения ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН, г. Красноярск, Россия;

Коленчукова О.А., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера — обособленного подразделения ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН, г. Красноярск, Россия.

Authors:

Lazareva A.M., PhD (Medicine), Junior Researcher, Laboratory of Clinical Pathophysiology, Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Smirnova S.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Scientific Direction of the Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Kolenchukova O.A., PhD, MD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Molecular-Cell Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 02.02.2021
Принята к печати 03.01.2022

Received 02.02.2021
Accepted 03.01.2022

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2022, vol. 12, no. 2, pp. 339–346

Инфекция и иммунитет
2022, Т. 12, № 2, с. 339–346

РОЛЬ МАРКЕРОВ ПОВЫШЕННОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ КИШЕЧНИКА В РАЗВИТИИ ИНФЕКЦИИ МОЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ У ДЕТЕЙ ПЕРВЫХ ТРЕХ ЛЕТ ЖИЗНИ

Е.В. Сергеева, А. Ни, Т.А. Шуматова, О.Г. Быкова, Н.Г. Приходченко, Е.С. Зернова

ФГБОУ ВО Тихоокеанский государственный медицинский университет, г. Владивосток, Россия

Резюме. Инфекция мочевыводящих путей (ИМВП) относится к числу актуальных проблем детской нефрологии и педиатрии. Несмотря на многочисленные работы, посвященные изучению патогенетических механизмов и разработке новых диагностических мероприятий у пациентов с инфекцией мочевыводящих путей, многие вопросы патогенеза до сих пор не получили четкой интерпретации. Учитывая, что у детей первых трех лет жизни в клинической картине заболевания преобладают неспецифические симптомы, актуален поиск достоверных, ранних, неинвазивных способов диагностики инфекции мочевыводящих путей. Цель исследования — определить диагностическую и патогенетическую значимость протеинов, связывающих жирные кислоты, и белка зонулина в диагностике инфекции мочевыводящих путей у детей грудного и раннего возраста. *Материалы и методы.* Обследовано 120 детей в возрасте с 29 дня жизни и до 2 лет 11 месяцев и 29 дней включительно с инфекцией мочевыводящих путей. Группа контроля — 30 здоровых детей. Всем детям в сыворотке крови определяли уровень белков, связывающих жирные кислоты L-FABP и I-FABP, в моче определяли уровень I-FABP, L-FABP и зонулина методом энзимсвязанного иммуносорбентного анализа. *Результаты.* В сыворотке крови детей с инфекцией мочевыводящих путей были значительно повышены уровни L-FABP и I-FABP в сравнении с их значениями у детей контрольной группы (L-FABP — 753,94±26,16 и 148,7±19,6 нг/мл, I-FABP — 92,97±1,41 и 18,03±3,03 нг/мл соответственно, $p < 0,001$). Фракции протеинов L-FABP и I-FABP в моче у больных детей также определялись на более высоком уровне, чем у здоровых (6,96±0,19 и 1,01±0,25 нг/мл и 0,37±0,01 и 0,1±0,02 нг/мл соответственно при $p < 0,001$). Содержание зонулина в моче было повышено (2,84±0,12 нг/мл) у больных детей по сравнению со здоровыми (0,17±0,04 нг/мл при $p < 0,001$). *Заключение.* Проведенное исследование позволило выделить ранние маркеры повреждения почек и мочевых путей (L-FABP, I-FABP, ZO), участвующие в развитии воспалительного бактериального процесса, а определение I-FABP, L-FABP, зонулина в моче может быть использовано для неинвазивной диагностики ИМВП у детей грудного и раннего возраста.

Ключевые слова: *инфекция мочевыводящих путей, патогенез, дети грудного и раннего возраста, белки, связывающие жирные кислоты (L-FABP, I-FABP), зонулин, диагностика.*

Адрес для переписки:
Сергеева Елена Васильевна
690002, Россия, г. Владивосток, пр. Острякова, 2,
ФГБОУ ВО Тихоокеанский государственный
медицинский университет.
Тел.: 8 (423) 242-07-16.
E-mail: sergeeva.elenav@mail.ru

Contacts:
Elena V. Sergeeva
690002, Russian Federation, Vladivostok, pr. Ostryakova, 2,
Pacific State Medical University.
Phone: +7 (423) 242-07-16.
E-mail: sergeeva.elenav@mail.ru

Для цитирования:
Сергеева Е.В., Ни А., Шуматова Т.А., Быкова О.Г., Приходченко Н.Г., Зернова Е.С. Роль маркеров повышенной проницаемости кишечника в развитии инфекции мочевыводящих путей у детей первых трех лет жизни // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 2. С. 339–346. doi: 10.15789/2220-7619-TRO-1799

Citation:
Sergeeva E.V., Nee A., Shumatova T.A., Bykova O.G., Prikhodchenko N.G., Zernova E.S. The role of increased intestinal permeability markers in developing urinary tract infection in children of the first three years of life // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 2, pp. 339–346. doi: 10.15789/2220-7619-TRO-1799

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-TRO-1799

THE ROLE OF INCREASED INTESTINAL PERMEABILITY MARKERS IN DEVELOPING URINARY TRACT INFECTION IN CHILDREN OF THE FIRST THREE YEARS OF LIFE

Sergeeva E.V., Nee A., Shumatova T.A., Bykova O.G., Prikhodchenko N.G., Zernova E.S.

Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. Urinary tract infection (UTI) is one of the urgent problems in pediatric nephrology and pediatrics. Despite numerous works devoted to the study of pathogenetic mechanisms and development of new diagnostic measures in patients with urinary tract infection, many questions on pathogenesis have not yet been clearly elucidated. Considering that non-specific symptoms prevailing in the disease clinical picture in children of the first three years of life, it is necessary to search for reliable, early, non-invasive methods for diagnosing urinary tract infections. Purpose of the study is to determine diagnostic and pathogenetic significance of proteins that bind fatty acids as well as zonulin in diagnosis of urinary tract infection in children of the first three years of life. *Materials and methods.* There were examined 120 children, aged from 29 days of life to 2 years 11 months and 29 days inclusive with urinary tract infection. Control group — 30 healthy children. All children were tested for serum level of proteins that bind fatty acids L-FABP and I-FABP, and the level of I-FABP, L-FABP and zonulin was measured in urine by enzyme-linked immunosorbent assay. *Results.* In the blood serum of children with urinary tract infection, the levels of L-FABP and I-FABP were significantly increased compared with those in children of the control group (L-FABP — 753.94±26.16 ng/ml vs. 148.7±19.6 ng/ml, I-FABP — 92.97±1.41 ng/ml vs. 18.03±3.03 ng/ml, respectively, $p < 0.001$). Fractions of urine proteins L-FABP and I- FABP in sick vs. healthy children were also determined at a higher level (6.96±0.19 ng/ml and 1.01±0.25 ng/ml vs. 0.37±0.01 ng/ml and 0.1±0.02 ng/ml, respectively, at $p < 0.001$). The level of urine zonulin was increased (2.84±0.12 ng/ml) in sick vs. healthy children (0.17±0.04, $p < 0.05$). *Conclusion.* The study allowed to identify early markers of kidney and urinary tract damage (L-FABP, I-FABP, ZO) involved in developing inflammatory bacterial process, whereas measuring urine I-FABP, L-FABP, zonulin level can be used for non-invasive UTI diagnostics in infants and young children.

Key words: *urinary tract infection, pathogenesis, infants and young children, fatty acid binding proteins (L-FABP, I-FABP), zonulin, diagnostics.*

Введение

Инфекция мочевыводящих путей (ИМВП) относится к наиболее часто встречающимся бактериальным инфекциям у детей [11]. Частота развития данного заболевания варьирует в зависимости от пола, возраста и расы пациентов, но особенно она актуальна для детей грудного и раннего возраста [3, 11].

Известно множество экзогенных и эндогенных факторов, играющих роль в патогенезе активации воспаления в мочевыводящих путях, среди которых важное место отводится микробиоте кишечника [12, 13]. Нарушение нормальной микробиоты может привести к дисбактериозу кишечника, дисфункции желудочно-кишечного барьера и бактериальной транслокации [7, 16]. Так, в работах J. Bien и соавт. (2012 г.) показано, что при нарушении гомеостаза в кишечнике штаммы *E. coli*, которые при благоприятных условиях являются частью нормальной микрофлоры, приобретают специфические факторы вирулентности и взывают развитие инфекции различной степени тяжести [9]. Избыточный рост патогенной микрофлоры приводит к повреждению регуляции межклеточных плотных контактов (TJ) в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ), нарушению микроциркуляции и, в конечном счете — транслокации бактерий в систему кровотока. Оценить измененную структуру TJ возможно с помощью маркеров целостности кишечного эпителия, которые помогают выявить повреждения не только в ЖКТ, но и мочевыводящих путях.

Одним из физиологических регуляторов герметичности TJ и функции кишечного барьера является протеин зонулин (ZO). Это единственный белок 47 kDa, который выделяется из мембранного комплекса, образуя плотное соединение TJ в апикальной части эндотелия кишечника [20]. Экспериментальные исследования показали, что повышение концентрации ZO происходит параллельно увеличению проницаемости кишечника [6, 22]. Доказана роль ZO в широком спектре заболеваний — болезнях кишечника (болезнь Крона, целиакия, колит), рассеянном склерозе, ревматоидном артрите, сахарном диабете 1 типа, а также некоторых почечных патологиях (фиброз почек при хронической болезни почек (ХБП), почечная нефропатия у пациентов с сахарным диабетом и нефротический синдром [6, 20, 22]).

К перспективным маркерам оценки проницаемости кишечника относят протеины, связывающие жирные кислоты, — в первую очередь I-FABP (FABP2, или кишечная фракция), но также, согласно исследованиям последних лет, и L-FABP (FABP1, или печеночная фракция) [10, 14]. Данные пептиды используют в качестве предикторов острого почечного повреждения, при оценке степени фиброза в по-

чечной ткани, а также у пациентов с риском развития почечной нефропатии [5].

Таким образом, в доступной нам литературе нет сведений об изучении роли дисфункции барьера кишечника и повышенной проницаемости в развитии ИМВП, особенно у детей первых лет жизни. Поэтому целью нашего исследования было определить патогенетическое значение ZO и белков, связывающих жирные кислоты FABP (FABP2 и FABP1), в развитии ИМВП у детей первых трех лет жизни.

Материалы и методы

В исследование было включено 120 детей (основная группа) в возрасте с 29 дня жизни и до 2 лет 11 месяцев и 29 дней включительно, средний возраст составил 15,8±1,47 месяцев. Все обследованнные имели диагноз «ИМВП» и находились на лечении в нефрологическом отделении ГБУЗ Краевая детская клиническая больница № 1 г. Владивостока. В группу контроля вошли 30 детей, сопоставимых по гендерным и возрастным признакам, не имеющих в анамнезе и на момент обследования заболеваний мочевыводящих путей. Перед началом исследования от всех родителей (законных опекунов) было получено информированное согласие на проведение диагностических мероприятий их детям. Работа была одобрена независимым междисциплинарным этическим комитетом при ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России (протокол № 3 от 04.06.2018).

Всем детям в начале исследования, до назначения антибактериальной терапии, кроме общепринятых стандартных лабораторных исследований, на иммуноферментном автоматическом анализаторе с помощью метода энзим-связанного иммуносорбентного анализа (ELISA) в сыворотке крови определяли уровень протеинов FABP2 и FABP1, а в моче кроме фракции FABP — уровень зонулина. В работе использовались реагенты фирмы Cloud–Clone Corp (США).

Статистические данные были обработаны с помощью программ Excel (Microsoft Office, 2018) в операционной среде Windows 10 и с использованием программы StatTech v. 2.1.0. С помощью теста Колмогорова–Смирнова, критерия согласия Пирсона (хи-квадрат), по эксцессу и асимметрии проводилась оценка характера распределения. Все количественные величины рассчитывались в виде «среднее ± стандартное отклонение». При нормальном распределении статистический анализ проводился с использованием t-критерия Стьюдента, если нормальность распределения была опровергнута, использовался критерий Манна–Уитни. Корреляция между исследуемыми признаками проводилась с помощью рангового коэффициента Пирсона, различия считались значимыми при $p < 0,05$. Для оценки диагностической значимости количественных признаков при прогнозировании определенного исхода применялся метод анализа ROC-кривых. Разделяющее значение количественного признака в точке cut-off определялось по наивысшему значению индекса Юдена.

Результаты

В клинической картине ИМВП на первом месте по частоте встречаемости был зарегистрирован интоксикационный синдром у 102 (85,00±3,26%) человек, на втором месте — болевой синдром, он регистрировался у 94 пациентов (78,33±3,76%), на третьем — расстройство мочеиспускания в виде частых и болезненных микций — 42 человека (35,00±4,35%), а у 14 детей (11,67±2,93%), наоборот, отмечалось снижение частоты мочеиспусканий до 3–4 раз в день.

При анализе данных анамнеза было выявлено, что у 104 (86,67±3,10%) детей в первые 6 месяцев жизни фиксировались функциональные нарушения кишечника, такие как кишечные колики, метеоризм, запоры. Сопутствующими состояниями являлись отягощенный аллергоанамнез — у 48 (40,00±4,47%) детей грудного и раннего возраста, перинатальное поражение центральной нервной системы — у 25 (20,83±3,71%), синдром запоров диагностирован у 23 (19,17±3,59%) детей, малые аномалии развития сердца — у 6 (5,00±1,99%).

У всех детей с ИМВП при лабораторном обследовании общего анализа мочи регистрировался мочевой синдром в виде лейкоцитурии разной степени выраженности, гематурии — у 19 пациентов (15,83±3,33%), протеинурия выявлена у 22 (18,33±3,53%), в среднем составила 0,81±0,1 г/л. Бактериурия в общем анализе мочи диагностировалась у 28 детей (23,33±3,86%). Повышение суточной экскреции оксалатов (более 1 мг/кг/сут) зарегистрировано у 26 (21,67±3,76%) детей, а уратов (более 10 мг/кг/сут) — у 24 (20,00±3,65%) пациентов. В бактериологических образцах мочи выявлено преобладание уропатогенов семейства *Enterobacteriaceae*. В 23 пробах мочи (62,15±7,97%) выделена *E. coli*, в шести пробах (16,22%) — представители рода *Proteus* (*P. mirabilis* — 8,11% и *P. vulgaris* — 8,11%), остальные микроорганизмы встречались в единичных случаях — *S. epidermidis* (5,41%), *E. aerogenes* (5,41%),

Таблица 1. Средняя концентрация протеинов, связывающих жирные кислоты, в сыворотке крови у детей (M±m)

Table 1. Average concentration of serum proteins that bind fatty acids in children (M±m)

Показатель Parameter	I группа Group I	II группа Group II
I-FABP, нг/мл I-FABP, ng/ml	92,97±1,41*	18,03±3,03
L-FABP, нг/мл L-FABP, ng/ml	753,94±26,16*	148,7±19,6

Примечание. * — различия статистически значимы ($p < 0,001$) при сравнении показателей пациентов I и II групп.

Note. * — significant differences ($p < 0,001$) while comparing inter-group parameters.

E. faecalis (5,41%). У одного из пациентов в мочевой пробе была выявлена *P. aeruginosa* (2,7%), а у другого — грибы рода *Candida* (2,7%).

В клиническом анализе крови были зафиксированы изменения, характерные для бактериального воспаления в виде лейкоцитоза (у 68 (56,67±4,52%) больных в среднем количество лейкоцитов составило 14,29±0,57 × 10^9/л), нейтрофильного сдвига влево [у 72 (60,00±4,47%) пациентов (при среднем значении 64,62±2,55%)], повышения скорости оседания эритроцитов (СОЭ) (у 45 (37,50±4,42%) человек) и анемического синдрома (у 12 (10,00±2,74%) детей). Уровень креатинина и мочевины в биохимическом анализе крови у всех обследуемых детей был в пределах возрастной нормы и в среднем составил 32,14±1,12 мкмоль/л и 2,15±0,12 ммоль/л соответственно. Повышение уровня трансаминаз выявлено у 60 (50,00±4,56%) детей грудного и раннего возраста, преимущественно за счет АСТ, при среднем значении 58,26±2,64 ед/л. Уровни показателей общего билирубина и его фракций, общего белка, мочевой кислоты не были повышены и соответствовали возрастным нормам. С-реактивный белок (СРБ) был повышен у 22 (18,33±3,53%) пациентов и варьировал от 30 до 60 мг/л.

Таблица 2. Средняя концентрация протеинов, связывающих жирные кислоты, и зонулина в моче у детей (M±m)

Table 2. Average concentration of urine proteins that bind fatty acids and zonulin in children (M±m)

Показатель Parameter	I группа Group I	II группа Group II
I-FABP, нг/мл I-FABP, ng/ml	0,37±0,01*	0,1±0,02
L-FABP, нг/мл L-FABP, ng/ml	6,96±0,19*	1,01±0,25
ZO, нг/мл ZO, ng/ml	2,84±0,12*	0,17±0,04

Примечание. * — различия статистически значимы ($p < 0,001$) при сравнении показателей пациентов I и II групп.

Note. * — significant differences ($p < 0,001$) while comparing inter-group parameters.

При эхографическом исследовании почек у 15 (12,50±3,02%) обследованных детей с ИМВП визуализировались признаки активного воспаления в почке. Признаки расширения ЧЛС выявлены у 69 (56,67±4,52%) детей, размер варьировал от 0,5 до 1 см. У 26 (21,67±3,76%) пациентов регистрировались множественные гиперэхогенные включения в чашечно-лоханочной системе, а у двух детей были выявлены конкременты в почках. У 12 (10,00±2,74%) детей выявлены ультразвуковые признаки аномалий развития МВС, подтвержденные рентгеноурологическими исследованиями. Методом экскреторной урографии диагностированы аномалии положения почек, удвоение почек, гидрокаликоз, признаки воспалительного процесса в ЧЛС у 8 (6,67%) пациентов. С помощью микционной цистоуретрографии у 6 (5%) пациентов диагностирован пузырно-мочеточниковый рефлюкс (ПМР).

Нами установлено, что в сыворотке крови у детей с ИМВП уровень пептидов, связывающих жирные кислоты, регистрировался на более высоком уровне, чем у здоровых детей ($p < 0,001$). Средняя концентрация кишечной и печеночной формы пептида FABP в основной группе в пять раз превышала показатель группы контроля (табл. 1).

Далее мы определили уровень зонулина и фракций FABP в моче. Было установлено, что концентрация ZO у детей с ИМВП была на достоверно более высоком уровне, чем у детей контрольной группы. Нами выявлено, что у детей с ИМВП уровень исследуемых белков FABP в моче не так значительно, но также достоверно ($p < 0,001$) отличался от его значений у здоровых детей. Концентрация I-FABP превышала показатели контрольной группы в основной группе более чем в 3,7 раза, а уровень L-FABP более чем в 6,8 раза (табл. 2)

Для оценки диагностической эффективности предложенных маркеров был проведен ROC-анализ и определен показатель площади под ROC-кривыми — AUC.

Величина AUC для концентрации I-FABP в сыворотке крови составляет 1,000 с 95% ДИ: 1,000–1,000 (пороговое значение показателя I-FABP в сыворотке крови в точке cut-off, которому соответствовало наивысшее значение индекса Юдена составило 71,000, чувствитель-

ность 100%, специфичность 100%) (рис. 1), для L-FABP — 0,993±0,005 с 95% ДИ: 0,983–1,000. Полученная модель была статистически значимой (p < 0,001), пороговое значение показателя L-FABP в сыворотке крови в точке cut-off, которому соответствовало наивысшее значение индекса Юдена, составило 356,000, чувствительность 95,8%, специфичность 100% (рис. 2).

Уровень AUC для концентрации I-FABP в моче составляет 0,919±0,022 с 95% ДИ: 0,875–0,962 (оптимальный порог 0,122, чувствительность 99,2%, специфичность 70%), для L-FABP — 0,993±0,006 с 95% ДИ: 0,982–1,000 (оптимальный порог 4,003, чувствительность 100%, специфичность 96,7%), для ZO — 1,000±0,000 с 95% ДИ: 1,000–1,000 (оптимальный порог 1,002, чувствительность 100%, специфичность 100%).

Для оценки взаимосвязи между уровнем предложенных пептидов и основных диагностических маркеров ИМВП проведен корреляционный анализ данных. Результаты исследования показали наличие достоверных разнонаправленных связей слабой и умеренной силы между выбранными критериями, белками, связывающими жирные кислоты, и ZO. Наиболее значимыми являлись связи между уровнем зонулина мочи, L-FABP сыворотки крови, I-FABP сыворотки крови и микробным спектром мочи (r = 0,4 при p = 0,0041; r = 0,41 при p = 0,0036; r = 0,6 при p = 0,0011 соответственно); между концентрацией ZO мочи, L-FABP сыворотки крови, I-FABP и уровнем уратов (r = –0,33 при p = 0,0162; r = 0,24 при p = 0,0052; r = 0,34 при p = 0,0259 соответственно); между уровнем ZO, L-FABP мочи, L-FABP сыворотки крови и уровнем АСТ (r = –0,24 при p = 0,021; r = 0,42 при p = 0,0038; r = 0,50 при p = 0,0016 соответственно).

Обсуждение

Изменение целостности кишечного барьера связано с образованием каскада иммунных реакций, поражающих органы вне ЖКТ, что приводит к формированию сердечно-сосудистых, аллергологических, аутоиммунных и нефрологических заболеваний [20]. Под воздействием различных индукторов воспаления происходит повреждение структуры TJ и активация Toll-подобных рецепторов (TLR), основная функция которых — распознавать патогены и формировать иммунный ответ. Комплекс патологических сдвигов в микробиоте кишечника способствует выработке веществ, обладающих гепатотоксичными свойствами, что,

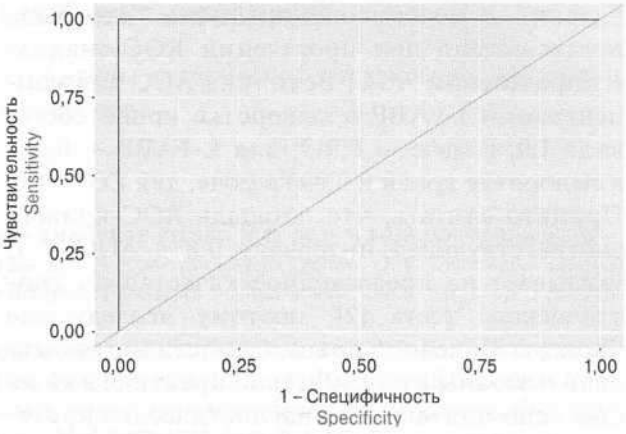

Рисунок 1. ROC-кривая диагностической эффективности I-FABP в сыворотке крови у детей

Figure 1. ROC-curve of diagnostic efficiency of serum I-FABP in children

в свою очередь, еще больше усиливает кишечную проницаемость, активирует окислительный стресс, выработку противовоспалительных цитокинов и способствует транслокации патогенной микрофлоры в портальную систему, а далее гематогенным путем в «органы-мишени» [1, 4].

Известно, что в ответ на воспаление в ЖКТ происходит повышение уровня белков маркеров проницаемости кишечника: ZO и FABP [10, 14, 22]. Полученные нами данные о повышении концентрации FABP1 и FABP2 в сыворотке крови и моче, а также о повышении уровня зонулина в моче свидетельствуют о вовлечении протеинов в патологический процесс при развитии бактериального вос-

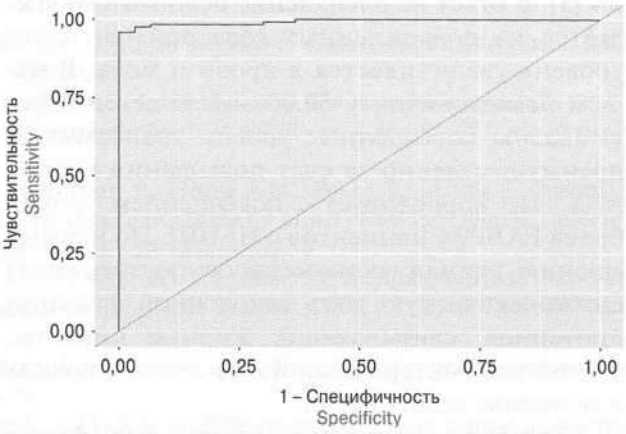

Рисунок 2. ROC-кривая диагностической эффективности L-FABP в сыворотке крови у детей

Figure 2. ROC-curve of diagnostic efficiency of serum L-FABP in children

паления в мочевыводящих путях. Это было подтверждено при проведении ROC-анализа и определении AUC. Величина AUC для концентрации I-FABP в сыворотке крови составила 1,0, в моче — 0,919; для L-FABP — 0,993 в сыворотке крови и 0,993 в моче, для ZO — 1,0. Принято считать, что площадь ROC-кривой, соответствующая интервалу $0,8 \leq AUC < 1$, указывает на превосходное качество диагностического теста [2], поэтому исследуемые маркеры кишечной проницаемости могут быть использованы в клинической практике в качестве вспомогательных диагностических критериев ИМВП.

Установлено, что повышение уровня белков, связывающих жирные кислоты, особенно печеночной формы, отражает степень тубулоинтерстициального повреждения почечной паренхимы и часто связано с ее острым повреждением [5]. В нашем исследовании ни у одного ребенка снижения функционального состояния почек выявлено не было, что указывает на необходимость более детального изучения патогенетической значимости данных белков. Так, известно, что белок FABP1 у детей с ИМВП может быть использован в качестве прогностического маркера формирования рубцовых тканей в почечной паренхиме [15, 21]. Кроме того, имеются исследования, предлагающие использовать повышенные значения протеина L-FABP в качестве маркера диагностики ПМР [8]. В нашем исследовании не было выявлено корреляционной связи между уровнем белков, связывающих жирные кислоты, и наличием ПМР.

Известно, что печеночная форма FABP синтезируется не только в кишечнике и проксимальных отделах канальцев почек, но и в печени [5]. В ответ на воспаление белок высвобождается из поврежденных гепатоцитов, и его уровень увеличивается в крови и моче. В нашем исследовании у 50,00±4,56% детей были выявлены повышенные уровни трансаминаз, преимущественно за счет повышения уровня АСТ, что коррелирует с повышением уровня белка FABP2 у пациентов с ИМВП. По нашему мнению, данная закономерность подтверждает патогенетическую роль печеночной фракции протеинов, связывающих жирные кислоты, в развитии бактериальной инфекции в почках и мочевыводящих путях.

Установлено, что интестинальная форма белка, связывающего жирные кислоты, является маркером острой кишечной ишемии и почечной нефропатии, а повышение концентрации данного протеина указывает на повреждение слизистой тонкого кишечника [5, 18, 19]. Однако работ, описывающих применение кишечного протеина у пациентов с ИМВП, в доступной нам литературе обнаружено не было. На наш взгляд, повышение уровня данного протеина в биологических жидкостях свидетельствует о воспалительных изменениях в почках и мочевыводящих путях и может быть использовано в диагностике ИМВП у детей грудного и раннего возраста.

В нашем исследовании уровень зонулина в моче у пациентов основной группы был на достоверно более высоком уровне, чем в группе контроля. Согласно современным данным, белок ZO является перспективным маркером оценки кишечной проницаемости [20, 22], в доступных нам источниках литературы уровень протеина оценивался в сыворотке крови и копрофильтратах, данных о значениях концентрации в моче выявлено не было.

Таким образом, с помощью маркеров I-FABP и ZO мы подтверждаем наличие повышенной кишечной проницаемости у пациентов с ИМВП и тем самым расширяем представления о патогенезе развития воспаления в органах мочевой системы.

В ряде работ доказана взаимосвязь между патогенной микрофлорой и уровнем белков регуляторов проницаемости кишечника. Установлено, что триггером высвобождения зонулина из кишечной мембраны являются кишечные патогены — *E. coli* и *S. enterica* [18]. А повышенное образование белков семейства FABP связано с воздействием липополисахаридов грамотрицательных бактерий [17]. В нашем исследовании при анализе микробного пейзажа выявлено преобладание представителей семейства *Enterobacteriaceae* (83,78%), которые в основном и являются причиной развития инфекции мочевыводящих путей у детей. Также обнаружена положительная корреляционная связь изучаемых маркеров и основных уропатогенов у детей с ИМВП, что согласуется с литературными данными.

Заключение

Таким образом, полученные результаты расширяют представление о патогенезе ИМВП у детей первых трех лет жизни. С помощью маркеров проницаемости кишечника, таких как белки, связывающие жирные кислоты FABP (кишечная и печеночная фракции), и ZO, возможно подтверждать нарушение барьерной функции кишечника при воспалительных заболеваниях почек. Определение уровня неинвазивных маркеров I-FABP, L-FABP и ZO,

как предикторов бактериального воспаления в мочевыделительной системе у детей грудного и раннего возраста может быть использовано в медицинской практике.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы/References

1. Воробьева Н.М., Ткачева О.Н. Повышенная проницаемость кишечной стенки и ее роль в возникновении сердечно-сосудистых заболеваний // Фарматека. 2020. № 3. С. 122–128. [Vorobieva N.M., Tkacheva O.N. Increased intestinal permeability and its role in the development of cardiovascular diseases. *Farmateka = Pharmateca, 2020, no. 3, pp. 122–128. (In Russ.)*]. *doi: 10.18565/pharmateca.2020.3.122-128*
2. Григорьев С.Г., Лобзин Ю.В., Скрипченко Н.В. Роль и место логистической регрессии и roc-анализа в решении медицинских диагностических задач // Журнал инфектологии. 2016. Т 8, № 4. С. 36–45. [Grigoryev S.G., Lobzin Yu.V., Skripchenko N.V. The role and place of logistic regression and roc analysis in solving medical diagnostic task. *Zhurnal infektologii = Journal Infectology, 2016, vol. 8, no. 4, pp. 36–45. (In Russ.)*] *doi: 10.22625/2072-6732-2016-8-4-36-45*
3. Громова Г.Г., Верижникова Л.Н., Бурмасова А.В., Шувалова О.И. Инфекция мочевой системы у детей и подростков // Вестник СурГУ. Медицина. 2018. № 4. С. 8–12. [Gromova G.G., Verizhnikova L.N., Burmasova A.Y., Shuvalova O.I. Urinary tract infectionin children and adolescents. *Vestnik SurGU. Meditsina = Herald of the Surgut State University. Medicine, 2018, no. 4, pp. 8–12. (In Russ.)*]
4. Карпеева Ю.С., Новикова В.П., Хавкин А.И., Ковтун Т.А., Макаркин Д.В., Федотова О.Б. Микробиота и болезни человека: возможности диетической коррекции // Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2020. Т. 65, № 5. С. 116–125. [Karpeeva Yu.S., Novikova V.P., Khavkin A.I., Kovtun T.A., Makarkin D.V., Fedotova O.B. Microbiota and human diseases: dietary correction. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics, 2020, vol. 65, no. 5, pp. 116–125. (In Russ.)*] *doi: 10.21508/1027-4065-2020-65-5-116-125*
5. Ни А., Сергеева Е.В., Шуматова Т.А., Приходченко Н.Г., Зернова Е.С., Григорян Л.А., Катенкова Э.Ю., Шишацкая С.Н. Возможности использования маркера L-FABP в диагностике повреждения почек // Современные проблемы науки и образования. 2018. № 4. [Nee A., Sergeeva E.V., Shumatova T.A., Prikhodchenko N.G., Zernova E.S., Grigoryan L.A., Katenkova E.Y., Shishackaya S.N. The use of the L-FABP marker in the diagnosis of kidney damage. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education, 2018, no. 4. (In Russ.)*] *URL: http://www.science – education.ru/ru/article/view?id=27874*
6. Приходченко Н.Г., Шуматова Т.А., Григорян Л.А., Гордеец А.В. Плотные межклеточные контакты и зонулин в формировании оральной толерантности и пищевой аллергии // Тихоокеанский медицинский журнал. 2019. № 4. С. 5–9. [Prikhodchenko N.G., Shumatova T.A., Grigoryan L.A., Gordeets A.V. Tight joints and zonulin in the formation of oral tolerance and food allergy. *Tihookeanskiy medicinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal, 2019, no. 4, pp. 5–9. (In Russ.)*] *doi: 10.34215/1609-1175-2019-4-5-9*
7. Al Khodor S., Shatat I.F. Gut microbiome and kidney disease: a bidirectional relationship. *Pediatr. Nephrol., 2017, no. 32, pp. 921–931. doi: 10.1007/s00467-016-3392-7*
8. Benzer M., Tekin Neijmann S., Gültekin N.D., Tekin A.U. Urinary L-FABP as a marker of vesicoureteral reflux in children: could it also have a protective effect on the kidney? *Int. Urol. Nephrol., 2017, no. 49, pp. 1–12. doi: 10.1007/s11255-016-1389-6*
9. Bien J., Sokolova O., Bozko P. Role of uropathogenic escherichia coli virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. *Int. Urol. Nephrol., 2012, vol. 2012: 681473. doi: 10.1155/2012/681473*
10. Coufal S., Kokesova A., Tlaskalova-Hogenova H., Frybova B., Snajdauf J., Rygl M., Kverka M. Urinary I-FABP, L-FABP, TFF-3, and SAA can diagnose and predict the disease course in necrotizing enterocolitis at the early stage of disease. *J. Immunol. Res., 2020: 3074313. doi: 10.1155/2020/3074313*
11. Kaufman J., Temple-Smith M., Sanci L. Urinary tract infections in children: an overview of diagnosis and management. *BMJ Paediatr. Open, 2019, vol. 3, no. 1: e000487. doi: 10.1136/bmjpo-2019-000487*
12. Lee J.R., Muthukumar T., Dadhania D., Toussaint N.C., Ling L., Pamer E., Suthanthiran M. Gut microbial community structure and complications after kidney transplantation: a pilot study. *Transplantation, 2014, vol. 98, no. 7, pp. 697–705. doi: 10.1097/TP.0000000000000370*
13. Paalanne N., Husso A., Salo J., Pievilainen O., Tejesvi M.V., Koivusaari P., Pirttila A.M., Pokka T., Mattila S., Jyrkas J., Turpeinen A., Uhari M., Renko M., Tapiainen T. Intestinal microbiome as a risk factor for urinary tract infections in children. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 2018, no. 37, pp. 1881–1891. doi: 10.1007/s10096-018-3322-7*
14. Pelsers M.M., Namiot Z., Kisielewski W., Namiot A., Januszkiewicz M., Hermens W.T., Glatz J.F. Intestinal-type and liver-type fatty acid-binding protein in the intestine. Tissue distribution and clinical utility. *Clin. Biochem., 2003, vol. 36, no. 7, pp. 529–535. doi: 10.1016/s0009-9120(03)00096-1*
15. Rafiei A., Abedi Arzefuni F., Mohammadjafari H., Yazdani-Charati J. The Urinary level of liver-type fatty acid binding protein in children with febrile UTI. *IJKD, 2020, vol. 14, no. 3, pp. 191–197.*
16. Ramezani A., Massy Z.A., Meijers B., Evenepoel P., Vanholder R., Raj D.S. Role of the gut microbiome in uremia: a potential therapeutic target. *Am. J. Kidney Dis., 2016, vol. 67, no. 3, pp. 483–498. doi: 10.1053/j.ajkd.2015.09.027*
17. Ramos-Benítez M.J., Ruiz-Jiménez C., Aguayo V., Espino A.M. Recombinant Fasciola hepatica fatty acid binding protein suppresses Toll-like receptor stimulation in response to multiple bacterial ligands. *Sci. Rep., 2017, vol. 7, no. 1: 5455. doi: 10.1038/s41598-017-05735-w*
18. Sturgeon C., Fasano A. Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases. *Tissue Barriers, 2016, vol. 4, no. 4: e1251384. doi: 10.1080/21688370.2016.1251384*

19. Tsai I.T., Wu C.C., Hung W.C., Lee T.L., Hsuan C.F., Wei C.T., Lu Y.C., Yu T.H., Chung F.M., Lee Y.J., Wang C.P. FABP1 and FABP2 as markers of diabetic nephropathy. *Int. J. Med. Sci., 2020, vol. 17, no. 15, pp. 2338–2345. doi: 10.7150 / ijms.49078*
20. Ulluwishewa D., Anderson R.C., McNabb W.C., Moughan P.J., Wells J.M., Roy N.C. Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *J. Nutr., 2011, vol. 141, no. 5, pp. 769–776. doi: 10.3945/jn.110.135657*
21. Yamanouchi S., Kimata T., Kino J., Kitao T., Suruda C., Tsuji S., Kurosawa H., Hirayama Y., Saito A., Kaneko K. Urinary C-megalin for screening of renal scarring in children after febrile urinary tract infection. *Pediatr. Res., 2018, vol. 83, pp. 662–668. doi: 10.1038/pr.2017.276*
22. Yu J., Shen Y., Zhou N. Advances in the role and mechanism of zonulin pathway in kidney diseases. *Int. Urol. Nephrol., 2021, vol. 53, no. 10, pp. 2081–2088. doi: 10.1007/s11255-020-02756-9*

Авторы:
Сергеева Е.В., аспирант, ассистент института педиатрии ФГБОУ ВО Тихоокеанский государственный медицинский университет, г. Владивосток, Россия;
Ни А., д.м.н., профессор института педиатрии ФГБОУ ВО Тихоокеанский государственный медицинский университет, г. Владивосток, Россия;
Шуматова Т.А., д.м.н., профессор, директор института педиатрии ФГБОУ ВО Тихоокеанский государственный медицинский университет, г. Владивосток, Россия;
Быкова О.Г., к.м.н., доцент института педиатрии ФГБОУ ВО Тихоокеанский государственный медицинский университет, г. Владивосток, Россия;
Приходченко Н.Г., д.м.н., доцент института педиатрии ФГБОУ ВО Тихоокеанский государственный медицинский университет, г. Владивосток, Россия;
Зернова Е.С., к.м.н., ассистент института педиатрии ФГБОУ ВО Тихоокеанский государственный медицинский университет, г. Владивосток, Россия.

Authors:
Sergeeva E.V., PhD Student, Assistant Professor, Institute of Pediatrics, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation;
Nee A., PhD, MD (Medicine), Professor, Institute of Pediatrics, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation;
Shumatova T.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Director of the Institute of Pediatrics, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation;
Bykova O.G., PhD (Medicine), Associate Professor, Institute of Pediatrics, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation;
Prikhodchenko N.G., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Institute of Pediatrics, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation;
Zernova E.S., PhD (Medicine), Assistant Professor, Institute of Pediatrics, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation.

Поступила в редакцию 24.09.2021
Принята к печати 14.01.2022

Received 24.09.2021
Accepted 14.01.2022

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2022, vol. 12, no. 2, pp. 347–356

Инфекция и иммунитет
2022, Т. 12, № 2, с. 347–356

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ СВЕРТЫВАЮЩЕЙ СИСТЕМЫ КРОВИ И ФОЛАТНОГО ЦИКЛА НА СОСТОЯНИЕ СЕРДЦА У БОЛЬНЫХ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКОЙ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ

К.М. Манахов, Д.С. Сарксян, М.В. Дударев, М.С. Чернобровкина, П.Ю. Прибыткова, С.В. Филимонова

ФГБОУ ВО Ижевская государственная медицинская академия Минздрава России, г. Ижевск, Россия

Резюме. Одним из характерных проявлений геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) является поражение сердечно-сосудистой системы. Наиболее перспективным направлением изучения причин возникновения кардиологических осложнений при ГЛПС следует считать изучение генетических особенностей пациента, в частности с учетом патогенеза заболевания, изучение полиморфизма генов свертывающей системы крови и фолатного цикла. Целью исследования было выявить влияние полиморфизма генов свертывающей системы крови и фолатного цикла на поражение сердца при ГЛПС. В летне-осенний период 2019 года на базе Республиканской клинической инфекционной больницы города Ижевска проведено исследование «случай–контроль», включившее в себя 19 пациентов. Изучение полиморфизма генов свертывающей системы крови и фолатного цикла проводили с использованием набора реагентов «РеалБест-Генетика Гемостаз (12)» на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США). Выделение ДНК проводили из лейкоцитов периферической крови с помощью набора реагентов «РеалБест Экстракция 100». Трансторакальная эхокардиография проводилась на ультразвуковом сканере Vivid 7 Dimension (GE Healthcare, США) матричным секторным датчиком M4S с фазированной решеткой и частотой сканирования 1,5–4,3 МГц. Статистический анализ проводился с использованием программ Statistica 12, IBM SPSS 22. Показатели в группах рассчитывали в виде медианы и интерквартильного размаха (Me [Q_{25}; Q_{75}]). Сравнение данных показателей производили по критерию Манна–Уитни. Сравнение распределения частот генотипов и аллелей в группах проводили с использованием критерия χ^2. Об ассоциации аллелей/генотипов с предрасположенностью к выявляемым изменениям судили по отношению рисков (OR), дополнительно рассчитывали 95% доверительный интервал (CI). Значение $p \leq 0,05$ считали статистически значимым. В ходе исследования у 7 больных были выявлены подвижные наложения на аортальном клапане в выходном отделе левого желудочка — признаки тромбоэндокардита. В группе больных с признаками тромбоэндокардита была выявлена более высокая частота аллеля A гена *F7:10976 G/A*, чем в группе больных без признаков тромбоэндокардита ($p = 0,0357$). Все пациенты, включенные в исследо-

Адрес для переписки:
Манахов Константин Михайлович
426067, Россия, Удмуртская Республика, г. Ижевск, ул. Труда, 1, ФГБОУ ВО Ижевская государственная медицинская академия Минздрава России.
Тел.: 8 912 013-85-19 (моб.).
E-mail: kmanakhov@yandex.ru

Contacts:
Konstantin M. Manakhov
426067, Russian Federation, Udmurt Republic, Izhevsk, Truda str., 1, Izhevsk State Medical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation.
Phone: +7 912 013-85-19 (mobile).
E-mail: kmanakhov@yandex.ru

Для цитирования:
Манахов К.М., Сарксян Д.С., Дударев М.В., Чернобровкина М.С., Прибыткова П.Ю., Филимонова С.В. Влияние полиморфизма генов свертывающей системы крови и фолатного цикла на состояние сердца у больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 2. С. 347–356. doi: 10.15789/2220-7619-GPI-1683

Citation:
Manakhov K.M., Sarksyan D.S., Dudarev M.V., Chernobrovkina M.S., Pribytkova P.Yu., Filimonova S.V. Gene polymorphism in blood coagulation system and folate cycle affecting heart condition in patients with hemorrhagic fever and renal syndrome // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 2, pp. 347–356. doi: 10.15789/2220-7619-GPI-1683

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-GPI-1683

вание, имели нормальную фракцию выброса левого желудочка (более 50%), но при проведении исследования speckle tracking с оценкой показателя усредненной пиковой продольной сократимости (GLPS AVG) у 11 пациентов было выявлено нарушение сократительной способности миокарда. У пациентов со сниженной GLPS AVG чаще выявлялся генотип G/G гена *FGB:-455 G/A*, чем у больных с сохранной сократительной способностью миокарда (p = 0,0397). У 8 пациентов выявлены признаки нарушения диастолического наполнения левого желудочка по 1 типу, прогностическое значение полиморфизма генов свертывающей системы крови и фолатного цикла в развитии данного осложнения не определено.

Ключевые слова: *геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, полиморфизм генов свертывающей системы крови и фолатного цикла, эхокардиография, тромбоэндокардит, усредненная пиковая продольная сократимость левого желудочка, нарушение диастолического наполнения левого желудочка по 1 типу.*

GENE POLYMORPHISM IN BLOOD COAGULATION SYSTEM AND FOLATE CYCLE AFFECTING HEART CONDITION IN PATIENTS WITH HEMORRHAGIC FEVER AND RENAL SYNDROME

Manakhov K.M., Sarksyan D.S., Dudarev M.V., Chernobrovkina M.S., Pribytkova P.Yu., Filimonova S.V.

Izhevsk State Medical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation, Izhevsk, Russian Federation

Abstract. One of the typical manifestations of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) is a damage to the cardiovascular system. The most promising direction of studying the causes of cardiac complications in HFRS should be considered the genetic patient characteristics, particularly taking into account the disease pathogenesis, study of polymorphism of the genes in the blood coagulation system and the folate cycle. The aim of the study was to find out an effect of polymorphism of the blood coagulation system and folate cycle genes on heart damage in hemorrhagic fever with renal syndrome. A case-control study was conducted by enrolling 19 patients in the 2019 summer–autumn period at the Republican Clinical Infectious Hospital in the City of Izhevsk. The study of polymorphism of the blood coagulation system and folate cycle genes was performed by using a set of reagents RealBest-Genetics Hemostasis (12) on the CFX96 amplifier (Bio-Rad, USA). DNA was extracted from peripheral blood leukocytes with reagents RealBest Extraction 100. Transthoracic echocardiography was performed on a Vivid 7 Dimension ultrasound scanner (GE Healthcare, USA) with a matrix sector sensor M4S with a phased array at scanning frequency of 1.5–4.3 MHz. Statistical analysis was performed using Statistica 12, IBM SPSS 22. The group parameters were calculated and depicted as median and interquartile range (ME [Q_{25}; Q_{75}]). Comparison of such parameters was carried out by using the Mann–Whitney criterion. Comparison of the frequency distribution for genotypes and alleles in the study groups was carried out using the criterion χ^2. The association of alleles/genotypes with a predisposition to detectable changes was assessed by the risk ratio (OR) additionally calculating 95% confidence interval (CI). The $p \leq 0.05$ was considered as statistically significant. During the study, 7 patients were found to have floating echoes on the aortic valve in the outlet of the left ventricle — signs of thrombotic endocarditis. In the group of patients with signs of thrombotic endocarditis, there was revealed a higher frequency of the allele A for the *F7:10976 G/A* gene compared to patients lacking signs of thrombotic endocarditis (p = 0.0357). All study patients had a normal left ventricular ejection fraction (more than 50%), but during the speckle-tracking study assessing the index of averaged peak longitudinal contractility (GLPS AVG), 11 patients with impaired myocardial contractility were identified. In patients with decreased GLPS AVG, the genotype G/G of the *FGB:-455 G/A* gene was detected more often compared to patients with preserved myocardial contractility (p = 0.0397). In 8 patients, signs of grade 1 diastolic left ventricular dysfunction were revealed, the prognostic importance of the gene polymorphism related to the blood coagulation system and folate cycle in developing this complication has not been determined.

Key words: *hemorrhagic fever with renal syndrome, gene polymorphism in blood clotting system and folate cycle, echocardiography, thrombotic endocarditis, global longitudinal peak strain, grade 1 diastolic left ventricular dysfunction.*

Одним из характерных проявлений геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) является поражение сердечно-сосудистой системы. Особенно актуально этот аспект заболевания выглядит на фоне имеющихся данных о высоких рисках возникновения сердечно-сосудистых осложнений после перенесенной ГЛПС [12, 13]. В клинической картине поражение сердца проявляется колющими болями [7], нарушениями ритма и проводимости (наджелудочковые и желудочковые экстрасистолии, пароксизмы фибрилляции предсердий, АВ-блокады 1 степени, СА-блокады 2 степени, нарушения внутрижелудочковой проводимости [29]), депрессией ST, инверсией T [5]. В ряде случаев в клинической картине появляются указания на развитие сердечной недостаточности: регистрируется повышение натрийуретического фактора и специфические эхокардиографические изменения [5, 30]. Учитывая патогенез, патоморфологии, клинические, лабораторные и инструментальные данные, ряд исследователей считают наиболее вероятной причиной выявленных изменений развитие миокардита.

Диагноз «миокардит» выставлялся на основании динамики ЭКГ и маркеров повреждения миокарда [5] или проведения МРТ и выявления характерных признаков Лейк-Луиз 2009 [21].

Кроме того, поражение эндотелия в сочетании с нарушением в свертывающей системе крови при ГЛПС может стать предрасполагающим фактором к поражению эндокарда — формированию тромботических/фибринозных наложений с возможностью их дальнейшего инфицирования [3].

Ввиду того что вирус ГЛПС внутри серотипа предельно однороден, причины различий в течении болезни, развитии осложнений, исходов необходимо искать в генетических особенностях человека. Одним из наиболее перспективных направлений в исследовании можно считать изучение полиморфизма генов свертывающей системы крови и фолатного цикла, что связано с особенностями патогенеза ГЛПС.

Цель исследования — изучить влияние полиморфизма генов свертывающей системы крови и фолатного цикла на эхокардиографические показатели реконвалесцентов ГЛПС.

Материалы и методы

Проведено исследование «случай–контроль». Обследованы 19 пациентов, перенесших ГЛПС в летне-осенний период в 2019 году и проходивших лечение в Республиканской клинической инфекционной больнице города Ижевска. Диагноз «ГЛПС» подтверждался методом ИФА. Возраст больных составил 39,0 [34,0; 45,0] лет, в группе обследуемых было 16 мужчин (84,21%) и 3 женщины (15,79%). Критерии включения в исследование: поступление в клинику в первые 48 часов заболевания, отсутствие хронических заболеваний в анамнезе. Критерии исключения: легкое течение заболевания, выявление хронических заболеваний в период обследования. Все пациенты дали письменное согласие на обследование.

Молекулярно-генетическое типирование для выявления полиморфизма генов *F2:20210 G/A, F5:1691 G/A, F7:10976 G/A, F13A1:c. 103 G/T, FGB:-455 G/A, ITGA2:807 C/T, ITGB3:1565 T/C, PAI-1:-675 5G/4G, MTR:2756 A/G, MTRR:66 A/G, MTHFR:677 C/T* и *MTHFR: 1298 A/C* проведено на ДНК, полученной из лейкоцитов периферической крови. Выделение ДНК производилось с помощью набора реагентов «РеалБест Экстракция 100». Для выявления полиморфизмов генов системы свертывания крови и фолатного цикла использовался набор реагентов «РеалБест-Генетика Гемостаз (12)». Для проведения полимеразной цепной реакции использовался регистрирующий амплификатор CFX96 (Bio-Rad, США).

Пациенты прошли эхокардиографическое исследование в день выписки из стационара. Трансторакальная эхокардиография проводилась на ультразвуковом аппарате Vivid 7 Dimension (GE Healthcare, США) матричным секторным датчиком M4S с фазированной решеткой и частотой сканирования 1,5–4,3 МГц. Измерялись и рассчитывались абсолютные и относительные структурно-геометрические параметры сердца — относительная толщина стенок левого желудочка (ОТС ЛЖ), конечно-систолические (КСО) и конечно-диастолические (КДО) объемы ЛЖ, индекс массы миокарда ЛЖ (ИММЛЖ), объем левого предсердия (ЛП) и правого предсердия (ПП) относительно площади тела. Измерялись функциональные параметры — фракция выброса (ФВ) по Тейхольцу и Симпсону, показатели кровотока на митральном (МК) и трикуспидальном (ТК) клапанах: скорость раннего диастолического наполнения ЛЖ, правого желудочка (ПЖ) — VE, скорости предсердного диастолического наполнения ЛЖ, ПЖ — VA, соотношение скоростей раннего и предсердного наполнения ЛЖ (VE/VA), время замедления раннего диастолического наполнения ЛЖ (DTE), время изоволюмического расслабления ЛЖ (IVRT).

При допплеровском исследовании измерялись скорости движения латеральной части фиброзных колец митрального и трикуспидального клапанов в систолу (s′), фазу раннего (e′) и предсердного (a′) диастолического наполнения; рассчитывалась скорость движения фиброзного кольца МК в фазу раннего диастолического наполнения (VE).

Определялись тип диастолического наполнения ЛЖ, рассчитывалось давление заклинивания легочной артерии (ДЗЛА), давление в правом предсердии.

Проводился анализ функции ЛЖ методом speckle tracking (отслеживание пятна) — исследовалась сократительная способность каждого из 17 сегментов, изучалась усредненная пиковая систолическая деформация (GLPS AVG).

Статистический анализ производился с использованием программ Microsoft Excel, Statistica 12, IBM SPSS 22. Показатели в группах рассчитывали в виде медианы и интерквартильного размаха (Me [Q_{25}; Q_{75}]). Сравнение данных показателей производили по критерию Манна–Уитни. Сравнение распределения частот генотипов и аллелей в группах проводили с использованием критерия χ^2. Об ассоциации аллелей/генотипов с предрасположенностью к выявляемым изменениям судили по отношению рисков (OR), дополнительно рассчитывали 95% доверительный интервал (CI). Значение $p \leq 0,05$ считали статистически значимым.

Результаты

В ходе исследования у 7 из обследованных больных были выявлены подвижные наложения на аортальном клапане в выходном отделе ЛЖ — признаки тромбоэндокардита. Исходя из этого, пациенты были разделены на 2 группы: 1 группа — с наличием признаков тромбоэндокардита, 2 группа — без признаков тромбоэндокардита (табл. 1).

Среди клинико-лабораторных параметров достоверные различия выявлены только по количеству тромбоцитов на момент выписки из стационара, что косвенно указывает на незавершенность патологических изменений, затрагивающих свертывающую систему крови. Структурно-геометрические и функциональные параметры миокарда в группах достоверно не различались.

Проанализировано распределение и отношение шансов полиморфизма генов свертывающей системы крови и фолатного цикла в группах (табл. 2).

В ходе статистического анализа установлена повышенная частота выявления мутантного аллеля А гена *F7:10976 G/A* в группе больных с тромбоэндокардитом.

Анализировалась функция миокарда — у ряда больных были выявлены признаки, соответствующие нарушению диастолического наполнения левого желудочка по 1 типу, выставленные в соответствии с рекомендациями Американского общества эхокардиографии: E/A на митральном клапане ≤ 0,8, E/e′ < 10, пиковая скорость кровотока на трикуспидальном клапане < 2,8 м/с, нормальный индекс объема левого предсердия [28]. У 8 пациентов выявлены признаки нарушения диастолического наполнения по 1 типу, у 11 пациентов — соответствующие норме показатели диастолического наполнения левого желудочка. В ходе исследования не удалось выявить клинико-лабораторных показателей в реконвалесцентный период, которые указывали бы на возможность развития нарушения релаксации левого желудочка. В ходе статистического анализа не установлена ассоциация генов свертывающей системы крови и фолатного цикла с нарушениями диастолического наполнения левого желудочка у реконвалесцентов ГЛПС.

Все пациенты, включенные в исследование, имели нормальную фракцию выброса (более 50%), но при проведении исследования speckle tracking с оценкой показателя усредненной пиковой продольной сократимости (GLPS AVG) у 11 пациентов было выявлено нарушение сократительной способности миокарда, у 8 пациентов она оставалась сохранной. В группе больных со сниженной GLPS AVG, по сравнению с группой больных с сохранной GLPS AVG, наблюдалась менее длительная лихорадка: 5,0 [4,0; 8,0] дней и 8,5 [6,0; 9,5] дней (p = 0,019), а также более низкие показатели тромбоцитов: 188,0 [102,0; 233,0] дней и 275,0 [229,5; 301,0] дней (p = 0,015). Установлено более частое выявление генотипа G/G гена *FGB:-455 G/A* у реконвалесцентов ГЛПС со сниженной GLPS AVG по сравнению с пациентами с сохранной GLPS AVG (генотип G/G наблюдался в 72,73 и 25% случаев (p = 0,0397) соответственно), причем наличие данного полиморфизма повышает отношение шансов нарушения сократительной функции миокарда в 8,0 (1,001–63,963) (p = 0,05).

Обсуждение

В ряде предыдущих работ уже было установлено влияние нарушений в системе гемостаза, а именно сосудисто-тромбоцитарного звена на тяжесть и развитие осложнений при ГЛПС. В ходе заболевания выявляется тромбоцитопения, связанная с агрегацией тромбоцитов и их адгезией к эндотелию микрососудов, а также их лизисом вследствие связывания с IgG, и их иммунное разрушение [4, 14]. В патогенезе тромбоцитопении играет роль снижение количества антитромбина, протеинов C и S. Установлено, что хантавирусы могут связывать тромбоциты через b3-интегрин-зависимый механизм с поверхностью эндотелиальных клеток: данное взаимодействие меняет функциональную активность тромбоцитов и эндотелия — вызывает повышенную сосудистую проницаемость [15].

Ранее уже были изучены ряд генов, влияющих на тяжесть течения ГЛПС, установлено влияние полиморфизма генов иммунной системы (MHC, TNF, IL-1) [19, 27, 25, 17, 9], эндотелия (VE-кадгерин, NOS) [1, 20], гемостаза (SERPINE1, ITGA2B) [22, 23], системы детоксикации (CYP1A1, GSTP1) [8] и их связь с тяжестью течения ГЛПС.

Наибольшую опасность из выявленных изменений может представлять тромбоэндокардит. Исследования ряда авторов указывают на ассоциацию развития эндокардита с генами *ITGA2:759C/T* и *MTR:2756A/G* [2], геном *MTHFR:677C/T* [10].

Полиморфизм гена *F7:10976 G/A* приводит к понижению экспрессии гена и снижению уровня фактора VII, что расценивается как маркер низкого риска тромбозов и инфаркта миокарда [18, 11, 32]. Также литературные данные указывают на возможность влияния гена F7 на течение инфекционных заболеваний — генотип G/A гена *F7:10976 G/A* предрасполагает к тяжелому течению гриппа [6].

Полиморфизм гена *FGB:-455 G/A* приводит к усиленной транскрипции гена и повышению вероятности развития тромбов, что в дальней-

Таблица 1. Основные клинические, лабораторные и эхокардиографические показатели пациентов в группах, сформированных по наличию или отсутствию признаков тромбоэндокардита

Table 1. The main clinical, laboratory and echocardiography parameters in patient groups stratified after verifying signs of thrombotic endocarditis

Показатель Parameter	**Пациенты с наличием признаков тромбоэндокардита** Patients with signs of thrombotic endocarditis **n = 7**	**Пациенты без признаков тромбоэндокардита** Patients without signs of thrombotic endocarditis **n = 12**	**p**
Возраст, годы Age, years	37,0 [34,0; 45,0]	41,5 [36,0; 47,5]	0,351
Мужчины Men	6 (85,71%)	10 (83,33%)	0,8908
Женщины Women	1 (14,29%)	2 (16,67%)	0,8908
Температура тела (макс.), °C Temperature max, °C	39,0 [39,0; 39,9]	39,0 [3,0; 39,25]	0,521
Длительность лихорадки > 37°C, дни Duration of fever > 37°C, days	5,0 [3,0; 8,0]	7,0 [5,5; 8,5]	0,104
Боль в поясничной области, % Pain in the lumbar region, %	7 (100%)	10 (83,33%)	0,2535
Олигурия, анурия, % Oliguria, anuria, %	5 (71,43%)	12 (100%)	0,0503
Олигурия, анурия, мл/сут Oliguria, anuria, ml/d	400,0 [200,0; 770,0]	550,0 [465,0; 725,0]	0,315
Олигурия, анурия, дни Oliguria, anuria, days	1,0 [1,0; 2,0]	1,0 [1,0; 2,0]	1,0
Эритроциты крови, 10^{12}/л Red blood cells, 10^{12}/l	4,49 [4,12; 5,14]	4,425 [4,155; 4,66]	0,8
Лейкоциты крови, 10^9/л White blood cells, 10^9/l	8,4 [8,3; 11,7]	8,7 [7,05; 10,55]	0,703
Тромбоциты, 10^9/л Platelets, 10^9/l	188,0 [135,0; 190,0]	247,5 [194,0; 287,0]	0,047
Скорость оседания эритроцитов, мм/час Sedimentation rate of erythrocytes, mm/hour	21,0 [19,0; 36,0]	25,0 [19,0; 33,0]	0,933
Протеинурия, > 0,03 г/л Proteinuria, > 0,03 g/l	0	0	–
Патологический мочевой осадок (лейкоцитурия, эритроцитурия, клетки почечного эпителия) Pathological urinary sediment (leukocyturia, erythrocyturia, renal epithelium)	0	0	–
Мочевина, ммоль/л Urea, mmol/l	6,3 [3,8; 7,8]	8,35 [6,85; 12,0]	0,139
Креатинин, мкмоль/л Creatinine, μmol/l	97,0 [74,0; 105,0]	130,5 [110,5; 133,0]	0,063
КСР, мм End-systolic size, mm	30,0 [27,0; 31,0]	31,0 [29,0; 33,5]	0,441
КДР, мм End-diastolic size, mm	51,0 [41,0; 53,0]	52,0 [49,5; 53,5]	0,287
КСО/ППТ по Тейхольцу, мл/м² End-systolic volume/body surface area, ml/m²	21,43 [18,3; 22,77]	24,33 [19,34; 25,13]	0,353
КДО/ППТ по Тейхольцу, мл/м² End-diastolic volume/body surface area, ml/m²	54,95 [38,46; 62,87]	63,39 [55,91; 69,12]	0,083
ФИ по Тейхольцу, % Teichholtz ejection fraction, %	69,0 [62,0; 73,0]	72,5 [64,5; 75,0]	0,445
ФИ по Симпсону, % Simpson ejection fraction, %	61,0 [59,0; 63,0]	64,0 [60,5; 68,0]	0,373

Окончание таблицы 1. Основные клинические, лабораторные и эхокардиографические показатели пациентов в группах, сформированных по наличию или отсутствию признаков тромбоэндокардита

Table 1. The main clinical, laboratory and echocardiography parameters in patient groups stratified after verifying signs of thrombotic endocarditis (continued)

Показатель Parameter	**Пациенты с наличием признаков тромбоэндокардита** Patients with signs of thrombotic endocarditis **n = 7**	**Пациенты без признаков тромбоэндокардита** Patients without signs of thrombotic endocarditis **n = 12**	**p**
ОТС ЛЖ LV RVT	0,35 [0,34; 0,4]	0,36 [0,33; 0,38]	0,767
ИММЛЖ, г/м² LVMI, g/m²	87,5 [68,0; 88,6]	91,45 [79,2; 100,1]	0,472
Объем ЛП/ППТ, мл/м² Volume of LA/BSA, ml/m²	20,88 [16,34; 23,2]	22,0 [18,54; 27,1]	0,499
Объем ПП/ППТ, мл/м² Volume of RA/BSA, ml/m²	19,23 [11,76; 20,62]	19,59 [17,18; 23,42]	0,237
DTE, мс | ms	133,0 [111,0; 170,0]	155,0 [140,5; 162,5]	0,388
IVRT, мс | ms	60,0 [52,0; 67,0]	59,0 [55,5; 65,5]	0,966
E/A на МК E/A on mitral valve	0,88 [0,73; 1,19]	0,88 [0,76; 1,02]	0,899
E′, см/с (усредненная) E′, cm/sec — averaged	11,0 [8,0; 12,0]	11,0 [8,0; 12,0]	0,765
E/E′	1,2 [0,8; 1,33]	0,98 [0,69; 1,36]	0,526
Скорость трикуспидальной регургитации, м/с Tricuspid regurgitation rate, m/sec	1,53 [1,38; 1,72]	1,74 [1,56; 1,98]	0,128
GLPS AVG, %	16,8 [15,7; 17,7]	18,35 [17,15; 19,75]	0,076
ДЗЛА, мм рт.ст. PAP, mmHg	7,9 [7,4; 10,4]	9,05 [7,95; 10,2]	0,331
Pcp (ПП), мм рт.ст. Pavg (RA), mmHg	7,9 [6,1; 8,5]	7,25 [5,95; 8,8]	0,866
Psis (ЛА), мм рт.ст. Psis (LA), mmHg	16,8 [15,3; 18,9]	20,5 [16,78; 23,45]	0,108
s′ ФКМК, см/с s′ FRMV, cm/sec	10,0 [8,0; 12,0]	11,5 [8,5; 12,5]	0,609
s′ ФКТК, см/с s′ FRTV, cm/sec	13,0 [10,0; 16,0]	15,0 [13,5; 17,5]	0,137
e′/a′ ФКМК e′/a′ FRMV	1,2 [0,8; 1,33]	0,98 [0,69; 1,36]	0,526
e′/a′ ФКТК e′/a′ FRTV	0,75 [0,69; 1,57]	0,84 [0,72; 0,96]	0,966
Антитела к вирусу ГЛПС IgM (+), % Antibodies to the virus HFRS IgM (+), %	100	100	–

Примечания. КСР — конечно-систолический размер, КДР — конечно-диастолический размер, КСО — конечно-систолический объем, КДО — конечно-диастолический объем, ППТ — площадь поверхности тела, ФИ — фракция изгнания, ОТС ЛЖ — относительная толщина стенки левого желудочка, ИММЛЖ — индекс массы миокарда левого желудочка, ЛП — левое предсердие, ПП — правое предсердие, DTE — время замедления раннего диастолического трансмитрального кровотока, IVRT — время изоволюмического расслабления ЛЖ, E/A — отношение пиковой скорости раннего диастолического наполнения ЛЖ к пиковой скорости позднего диастолического наполнения ЛЖ, E′ — усредненная скорость движения фиброзного кольца митрального клапана в фазу раннего диастолического наполнения, GLPS AVG — усредненная глобальная пиковая продольная систолическая деформация левого желудочка, ДЗЛА — давление заклинивания легочной артерии, Pcp (ПП) — среднее давление в правом предсердии, Psis (ЛА) — систолическое давление в легочной артерии, s′ ФКМК — пиковая систолическая скорость движения латеральной части фиброзного кольца митрального клапана, s′ ФКТК — пиковая систолическая скорость движения латеральной части фиброзного кольца трикуспидального клапана, e′/ a′ ФКМК — отношение скоростей движения латеральной части фиброзного кольца МК в фазы раннего (e′) и предсердного (a′) диастолического наполнения, e′/ a′ ФКТК — отношение скоростей движения латеральной части фиброзного кольца ТК в фазы раннего (e′) и предсердного (a′) диастолического наполнения.

Notes. ESS — end-systolic size, EDS — end-diastolic size, ESV — end-systolic volume, EDV — end-diastolic volume, BSA — body surface area, EF — ejection fraction, LV RVT — relative wall thickness of the left ventricle, LVMI — left ventricular mass index, LA — left atrium, RA — right atrium, DTE — deceleration time of early diastolic transmittal blood flow, IVRT — LV isovolumetric relaxation time, E/A — the ratio of the peak velocity of early diastolic LV filling to peak velocity of late diastolic LV filling, E′ — average speed of movement of the fibrous ring of the mitral valve in the phase of early diastolic filling, GLPS AVG — average global peak longitudinal systolic deformation of the left ventricle, PAP — pressure jamming pulmonary artery, Pavg (RA) — average pressure in the right atrium, Psis (LA) — systolic pulmonary artery pressure, s′ FRMV — peak systolic velocity of motion of the lateral portion of the fibrous ring of the mitral valve, s′ FRTV — peak systolic velocity of motion of the lateral portion of the fibrous ring of the tricuspid valve, e′/a′ FRMV — ratio of the speeds of movement of the lateral portion of the fibrous ring of the mitral valve in-phase early (e′) and atrial (a′) diastolic filling, e′/a′ FRTV — ratio of the speeds of movement of the lateral portion of the fibrous ring of TK in the early phase (e′) and atrial (a′) diastolic filling.

Таблица 2. Распределение и отношение шансов полиморфизма генов свертывающей системы крови и фолатного цикла в сравниваемых группах больных относительно наличия признаков тромбоэндокардита

Table 2. Distribution and odds ratio for gene polymorphism related to the coagulating blood system and the folate cycle in the groups of patients related to the signs of thrombotic endocarditis

Полиморфизм генов тромбофилии Trombophilia gene polymorphism		**Группа больных с признаками тромбоэндокардита** Group of patients with signs of thrombotic endocarditis **n = 7**	**Группа больных без признаков тромбоэндокардита** Group of patients without signs of thrombotic endocarditis **n = 12**	χ^2, p	OR (CI, 95%)	p
***F13:103 G/T*, %**	G/G	4 (57,14%)	9 (75,0%)	0,4192	0,444 (0,061–3,242)	0,424
	G/T	2 (28,58%)	3 (25,0%)	0,8646	1,2 (0,147–9,768)	0,865
	T/T	1 (14,29%)	0 (0%)	0,1786	–	–
	G	10 (71,43%)	21 (87,5%)	0,2177	0,357 (0,067–1,908)	0,228
	T	4 (28,57%)	3 (12,5%)	0,2177	2,8 (0,524–14,959)	0,228
***F2:20210 G/A*, %**	G/G	6 (85,71%)	12 (100%)	0,1786	–	–
	G/A	1 (14,29%)	0 (0%)	0,1786	–	–
	A/A	0 (0%)	0 (0%)	–	–	–
	G	13 (92,86%)	24 (100%)	0,1846	–	–
	A	1 (7,14%)	0 (0%)	0,1846	–	–
***F5:1691 G/A*, %**	G/G	7 (100%)	10 (83,33%)	0,2535	–	–
	G/A	0 (0%)	2 (16,67%)	0,2535	–	–
	A/A	0 (0%)	0 (0%)	–	–	–
	G	14 (100%)	22 (91,67%)	0,2671	–	–
	A	0 (0%)	2 (8,33%)	0,2671	–	–
***F7:10976 G/A*, %**	G/G	3 (42,86%)	10 (83,33%)	0,0671	0,15 (0,018–1,265)	0,081
	G/A	3 (42,86%)	2 (16,67%)	0,2111	3,75 (0,445–31,621)	0,224
	A/A	1 (14,29%)	0 (0%)	0,1786	–	–
	G	9 (64,28%)	22 (91,7%)	0,0357	0,164 (0,027–1,004)	0,05
	A	5 (35,72%)	2 (8,3%)	0,0357	6,111 (0,996–37,49)	0,05
***FGB:-455 G/A*, %**	G/G	5 (71,42%)	5 (41,67%)	0,2101	3,5 (0,473–25,901)	0,22
	G/A	1 (14,29%)	6 (50,0%)	0,1195	0,167 (0,015–1,838)	0,143
	A/A	1 (14,29%)	1 (8,33%)	0,6834	1,833 (0,096–34,849)	0,687
	G	11 (78,6%)	16 (66,7%)	0,4351	1,833 (0,396–8,492)	0,438
	A	3 (21,4%)	8 (33,3%)	0,4351	0,545 (0,118–2,526)	0,438
***ITGA2:807 C/T*, %**	C/C	5 (71,42%)	6 (50,0%)	0,3615	2,5 (0,341–18,332)	0,367
	C/T	1 (14,29%)	4 (33,33%)	0,1195	0,333 (0,029–3,8)	0,376
	T/T	1 (14,29%)	2 (16,67%)	0,8908	0,833 (0,062–11,277)	0,891
	C	11 (78,6%)	16 (66,7%)	0,4351	1,833 (0,396–8,492)	0,438
	T	3 (21,4%)	8 (33,3%)	0,4351	0,545 (0,118–2,526)	0,438
***ITGB3:1565 T/C*, %**	T/T	6 (85,71%)	6 (50,0%)	0,1195	6,0 (0,544–66,169)	0,143
	T/C	1 (14,29%)	4 (33,33%)	0,3631	0,333 (0,029–3,8)	0,376
	C/C	0 (0%)	2 (16,67%)	0,2535	–	–
	T	13 (92,9%)	16 (66,7%)	0,0670	6,5 (0,717–58,893)	0,096
	C	1 (7,1%)	8 (33,3%)	0,0670	0,154 (0,017–1,394)	0,096
***MTHFR:1298 A/C*, %**	A/A	3 (42,86%)	8 (66,67%)	0,3106	0,375 (0,055–2,555)	0,316
	A/C	3 (42,86%)	3 (25,0%)	0,4192	2,25 (0,308–16,411)	0,424
	C/C	1 (14,29%)	1 (0,083)	0,6834	1,833 (0,096–34,849)	0,687
	A	9 (64,3%)	19 (79,2%)	0,3105	0,474 (0,109–2,063)	0,32
	C	5 (35,7%)	5 (20,8%)	0,3105	2,111 (0,485–9,196)	0,32
***MTHFR:677 C/T*, %**	C/C	4 (57,14%)	6 (50,0%)	0,7636	1,333 (0,204–8,708)	0,764
	C/T	3 (42,86%)	4 (33,33%)	0,6780	1,5 (0,22–10,218)	0,679
	T/T	0 (0%)	2 (16,67%)	0,2535	–	–
	C	11 (78,6%)	16 (66,7%)	0,4351	1,833 (0,396–8,492)	0,438
	T	3 (21,4%)	8 (33,3%)	0,4351	0,545 (0,118–2,526)	0,438

Окончание таблицы 2. Распределение и отношение шансов полиморфизма генов свертывающей системы крови и фолатного цикла в сравниваемых группах больных относительно наличия признаков тромбоэндокардита

Table 2. Distribution and odds ratio for gene polymorphism related to the coagulating blood system and the folate cycle in the groups of patients related to the signs of thrombotic endocarditis (continued)

Полиморфизм генов тромбофилии Trombophilia gene polymorphism		**Группа больных с признаками тромбоэндокардита** Group of patients with signs of thrombotic endocarditis **n = 7**	**Группа больных без признаков тромбоэндокардита** Group of patients without signs of thrombotic endocarditis **n = 12**	χ^2, p	OR (CI, 95%)	p
***MTR:2756 A/G*, %**	A/A	4 (57,14%)	9 (75,0%)	0,7507	0,444 (0,061–3,242)	0,424
	A/G	2 (28,58%)	3 (25,0%)	0,8646	1,2 (0,147–9,768)	0,865
	G/G	1 (14,29%)	0 (0%)	0,1786	–	–
	A	10 (71,4%)	21 (87,5%)	0,2177	0,357 (0,067–1,908)	0,228
	G	4 (28,6%)	3 (12,5%)	0,2177	2,8 (0,524–14,959)	0,228
***MTRR:66 A/G*, %**	A/A	2 (28,58%)	3 (25,0%)	0,7171	1,2 (0,147–9,768)	0,865
	A/G	4 (57,14%)	5 (41,67%)	0,3496	1,867 (0,283–12,31)	0,517
	G/G	1 (14,29%)	4 (33,33%)	0,4687	0,333 (0,029–3,8)	0,376
	A	8 (57,1%)	11 (45,8%)	0,5012	1,576 (0,417–5,95)	0,502
	G	6 (42,9%)	13 (54,2%)	0,5012	0,635 (0,168–2,396)	0,502
***PAI-1:-675 5G/4G*, %**	5G/5G	0 (0%)	0 (0%)	–	–	–
	5G/4G	2 (28,58%)	6 (50,0%)	0,3615	0,4 (0,055–2,933)	0,367
	4G/4G	5 (71,42%)	6 (50,0%)	0,3615	2,5 (0,341–18,332)	0,367
	5G	2 (14,3%)	6 (25%)	0,4345	0,5 (0,086–2,904)	0,44
	4G	12 (85,7%)	18 (75%)	0,4345	2,0 (0,344–11,615)	0,44

Примечания. F13 — 13 фактор свертывания; F2 — протромбин; F5 — фактор Лейдена; F7 — проконвертин; FGB — фибриноген; ITGA2 — тромбоцитарный рецептор к коллагену, кодирует белок интегрин альфа-2; ITGB3 — тромбоцитарный рецептор фибриногена, кодирующий белок интегрин бета-3; MTHFR — метилентетрагидрофолатредуктаза; MTR — метионин-синтаза; MTRR — метионин-синтаза-редуктаза; PAI-1 — ингибитор активатора плазминогена 1 типа.

Notes. F13 — 13 clotting factor; F2 — prothrombin; F5 — factor V Leiden; F7 — proconvertin; FGB — fibrinogen; ITGA2 — thrombocyte receptor to collagen encoding protein integrin alpha-2; ITGB3 — fibrinogen thrombocyte receptor encoding protein integrin beta-3; MTHFR — methylenetetrahydrofolate reductase; MTR — methionine synthase; MTRR — methionine synthase reductase; PAI-1 —plasminogen activator inhibitor type 1.

шем может привести к тромбозам, инфарктам и инсультам [31, 24, 16]. Имеющаяся информация указывает, что полиморфизм *-455 G/A* гена FGB (ген фибриногена) может оказывать влияние на течение инфекционных заболеваний [26].

В ходе настоящего исследования удалось выявить влияние лишь 1 аллеля и 1 гена на развитие кардиальных проявлений у реконвалесцентов ГЛПС: аллель А гена *F7:10976 G/A* выявлялся чаще у пациентов с развившимися признаками тромбоэндокардита, а генотип G/G гена *FGB:-455G/A* часто обнаруживался при нарушении продольной пиковой деформации миокарда.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы/References

1. Байгильдина А.А., Исламгулов Д.В. Генетическая детерминированность изменения экспрессии VE-кадгерина и повышенной деэндотелизации сосудов при геморрагической лихорадке с почечным синдромом // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2012. Т. 4. С. 23–27. [Baigildina A.A., Islamgulov D.V. Genetic determinism of changes in VE-cadherin expression and increased vascular deendothelization in hemorrhagic fever with renal syndrome. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology, 2012, vol. 4, pp. 23–27. (In Russ.)*]
2. Бахарева Ю.С., Максимов В.Н., Иванова А.А., Чапаева Н.Н. Ассоциация генетических маркеров с развитием эндокардитов неинфекционной и инфекционной этиологии // Молекулярная медицина. 2018. Т. 16, № 6. С. 51–55. [Bakhareva Yu.S., Maksimov V.N., Ivanova A.A., Chapaeva N.N. Association of genetic markers with the development of endocarditis of noninfectious and infectious etiology. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine, 2018, vol. 16, no. 6, pp. 51–55. (In Russ.)*]
3. Давыдова Н.В., Алескеров Э.Э., Рогожкина Ю.А., Жмуров В.А. Клинический случай развития сочетанной патологии у пациента после перенесенной геморрагической лихорадки с почечным синдромом // Университетская медицина

Урала. 2019. Т. 5, № 1 (16). С. 72–74. [Davydova N.V., Aleskerov E.E., Rogozhkina Y.A., Zhmurov V.A. A clinical case of the pathology after suffering haemorrhagic fever with renal syndrome. *Universitetskaya meditsina Urala = Ural University Medicine, 2019, vol. 5, no. 1 (16), pp. 72–74. (In Russ.)*]

4. Мурзабаева Р.Т. Состояние имунной и интерфероновой систем у больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2003. Т. 5. С. 40–43. [Murzabayeva R.T. The immune and interferon systems in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases, 2003, vol. 5, pp. 40–43. (In Russ.)*]
5. Мухетдинова Г.А., Фазлыева Р.М., Ибрагимова Л.А., Мирсаева Г.Х., Тутельян А.В., Степанов О.С., Хасанова Г.М. Состояние сердечно-сосудистой системы у больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом // Инфекционные болезни. 2018. Т. 16, № 4. С. 48–54. [Mukhetdinova G.A., Fazlyeva R.M., Ibragimova L.A., Mirsaeva G.Kh., Tutelyan A.V., Stepanov O.S., Khasanova G.M. Cardiovascular characteristics of patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases, 2018, vol. 16, no. 4, pp. 48–54. (In Russ.)*] *doi: 10.20953/1729-9225-2018-4-48-54*
6. Тарбаева Д.А., Белокриницкая Т.Е. Генетические предикторы тяжелого осложненного гриппа A(H1N1) у беременных // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра сибирского отделения Академии медицинских наук. 2015. Т. 5, № 105. С. 100–106. [Tarbaeva D.A., Belokrinitskaya T.E. Genetic predictors of severe complicated influenza A(H1N1) in pregnant women. *Bjulleten Vostochno-Sibirskogo nauchnogo centra sibirskogo otdeleniya Akademii meditsinskikh nauk = Bulletin of the East Siberian Scientific Center SBRAMS, 2015, vol. 5, no. 105, pp. 100–106. (In Russ.)*]
7. Фигурнов В.А., Марунич Н.А., Гаврилов А.В., Фигурнова Е.В. Особенности клинического проявления и некоторые закономерности патогенеза при тяжелом течении геморрагической лихорадки с почечным синдромом // Тихоокеанский медицинский журнал. 2008. Т. 2, № 32. С. 71–76. [Figurnov V.A., Marunich N.A., Gavrilov A.V., Figurnova E.V. Pathomorphogenetic features of the hemorrhagic fever with nephritic syndrome in Far East Region. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal, 2008, vol. 2, no. 32, pp. 71–76. (In Russ.)*]
8. Хасанова Г.М., Тутельян А.В., Валишин Д.А., Хасанова А.Н. Прогностическая значимость полиморфизма генов ферментов детоксикации у больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом // Журнал инфектологии. 2016. Т. 8, № 1. С. 73–78. [Khasanova G.M., Tutelyan A.V., Valishin D.A., Hasanova A.N. Prognostic significance of detoxification enzyme gene polymorphism in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *Zhurnal infektologii = Journal Infectology, 2016, vol. 8, no. 1, pp. 73–78. (In Russ.)*]
9. Хунафина Д.Х., Хабелова Т.А., Кутуев О.И., Шамсиева А.М., Султанов Р.С., Бурганова А.Н., Галиева А.Т., Шайхуллина Л.Р., Ария Э.М. Полиморфизм генов TNFα, IL1B и IL1-RN у больных ГЛПС // Медицинский вестник Башкортостана. 2008. Т. 3, № 5. С. 77–82. [Khunafina D.H., Khabelova T.A., Kutuev O.I., Shamsieva A.M., Sultanov R.S., Burganova A.N., Galieva A.T., Shaichulina L.R., Aria E.M. TNFa, IL 1B, and IL1RN gene polymorphism in patients with HFRS. *Medicinskiy vestnik Bashkortostana = Medical Bulletin of Bashkortostan, 2008, vol. 3, no. 5, pp. 77–82. (In Russ.)*]
10. Чапаева Н.Н., Бахарева Ю.С., Серяпина Ю.В., Терехова А.Б., Демин А.А. Роль полиморфизма гемостаза в диагностике тромбоэмболических осложнений при небактериальном тромботическом эндокардите // Медицина и образование в Сибири. 2013. № 4: 59. [Chapayeva N.N., Bakhareva Y.S., Seryapina Y.V., Terekhova A.B., Demin A.A. Role of genic polymorphism of hemostasis system in diagnostics of tromboembolic episodes at abacterial thrombotic endocarditis. *Meditsina i obrazovanie v Sibiri = Journal of Siberian Medical Sciences, 2013, no. 4: 59. (In Russ.)*]
11. Шульман В.А., Аксютина Н.В., Никулина С.Ю., Назаров Б.В., Дудкина К.В., Максимов В.Н., Козлов В.В., Котловский М.Ю., Синяпко С.Ф., Платунова И.М. Генетические предикторы кардиоэмболического инсульта у больных с фибрилляцией предсердий // Российский кардиологический журнал. 2014. Т. 10, № 19. С. 29–33. [Shulman V.A., Aksiutina N.V., Nikulina S.Yu., Nazarov B.V., Dudkina K.V., Maksimov V.N., Kozlov V.V., Kotlovsky M.Yu., Sinyapko S.F., Platunova I.M. Genetic predictors for cardioembolic stroke in patients with atrial fibrillation. *Rossiyskiy kardioembolicheskiy zhurnal = Russian Journal of Cardiology, 2014, vol. 10, no. 19, pp. 29–33. (In Russ.)*]
12. Connolly-Andersen A., Ahlm K., Ahlm C., Klingström J. Puumala virus infections associated with cardiovascular causes of death. *Emerg. Infect. Dis., 2013, vol. 19, pp. 126–128. doi: 10.3201/eid1901.111587*
13. Connolly-Andersen A., Hammargren E., Whitaker H., Eliasson M., Holmgren L.E., Klingström J., Ahlm C. Increased risk of acute myocardial infarction and stroke during hemorrhagic fever with renal syndrome: a self-controlled case series study. *Circulation, 2014, vol. 129, no. 12, pp. 1295–1302. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001870*
14. Denecke B., Bigalke B., Haap M. Hantaviruses infection: a neglected diagnosis in thrombocytopenia and fever. *Mayo Clinic Proc., 2010, vol. 85, no. 11, pp. 1016–1020. doi: 10.4065/mcp.2009.0040*
15. Gavrilovskaya I., Gorbunova E., Mackow E. Pathogenic hantaviruses direct the adherence of quiescent platelets to infected endothelial cells. *J. Virol., 2010, vol. 84, no. 9, pp. 4832–4839. doi: 10.1128/JVI.02405-09*
16. Gu L., Liu W., Yan Y., Su L., Wu G., Liang B., Tan J., Huang G. Influence of the β-fibrinogen-455G/A polymorphism on development of ischemic stroke and coronary heart disease. *Thromb. Res., 2014, vol. 133, no. 6, pp. 993–1005. doi: 10.1016/j.thromres.2014.01.001*
17. Kanerva M., Vaheri A., Mustonen J., Partanen J. High-producer allele of tumour necrosis factor-alpha is part of the susceptibility MHC haplograde in severe Puumala virus-induced Nephropathia epidemica. *Scand. J. Infect. Dis., 1998, vol. 30, no. 5, pp. 532–534. doi: 10.1080/00365549850161629*
18. Kathiresan S., Yang Q., Larson M.G., Camargo A.L., Tofler G.H., Hirschhorn J.N., Gabriel S.B., O'Donnell C.J. Common genetic variation in five thrombosis genes and relations to plasma hemostatic protein level and cardiovascular disease risk. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2006, vol. 26, no. 6, pp. 1405–1412. doi: 10.1161/01.ATV.0000222011.13026.25*
19. Korva M., Saksida A., Kunilo S., Vidan Jeras B., Avsic-Zupanc T. HLA-Associated hemorrhagic fever with renal syndrome disease progression in slovenian patients. *Clin. Vaccine Immunol., 2011, vol. 18, no. 9, pp. 1435–1440. doi: 10.1128/CVI.05187-11*
20. Koskela S., Laine O., Makela S., Mäkelä S., Pessi T., Tuomisto S., Huhtala H., Karhunen P.J., Pörsti I., Mustonen J. Endothelial nitric oxide synthase G894T polymorphism associates with disease severity in Puumala hantavirus infection. *PLoS One, 2015, vol. 10, no. 11: e0142872. doi: 10.1371/journal.pone.0142872*

21. Krumm P., Zitzelsberger T., Gawaz M., Greulich S. Young patient with hantavirus-induced myocarditis detected by comprehensive cardiac magnetic resonance assessment. *BMC Infect. Dis., 2019, vol. 19, no. 1: 15. doi: 10.1186/s12879-018-3658-8*
22. Laine O., Joutsi-Korhonen L., Mäkelä S., Mikkelsson J., Pessi T., Tuomisto S., Huhtala H., Libraty D., Vaheri A., Karhunen P., Mustonen J. Polymorphisms of PAI-1 and platelet GP Ia may associate with impairment of renal function and thrombocytopenia in Puumala hantavirus infection. *Thromb. Res., 2012, vol. 129, pp. 611–615. doi: 10.1016/j.thromres.2011.11.007*
23. Liu Z., Gao M., Han Q., Lou S., Fang J. Platelet glycoprotein IIb/IIIa (HPA-1 and HPA-3) polymorphisms in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *Hum. Immunol., 2009, vol. 70, pp. 452–456. doi: 10.1016/j.humimm.2009.03.009*
24. Luo H., Li X., Jiang A., Zhang B., Bi P., Dong Y., Guo Y. Associations of β-Fibrinogen polymorphisms with the risk of ischemic stroke: a meta-analysis. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 2019, vol. 28, no. 2, pp. 243–250. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.09.007*
25. Mäkelä S., Hurme M., Ala-Houhala I., Mustonen J., Koivisto A.M., Partanen J., Vapalahti O., Vaheri A., Pasternack A. Polymorphism of the cytokine genes in hospitalized patients with Puumala hantavirus infections. *Nephrol. Dial. Transplant., 2001, vol. 16, no. 7, pp. 1368–1373. doi: 10.1093/ndt/16.7.1368*
26. Manocha S., Russell J.A., Sutherland A.M., Wattanathum A., Walley K.R. Fibrinogen-beta gene haplograde is associated with mortality in sepsis. *J. Infect., 2007, vol. 54, no. 6, pp. 572–577. doi: 10.1016/j.jinf.2006.10.001*
27. Mustonen J., Partanen J., Kanerva M., Pietilä K., Vapalahti O., Pasternack A., Vaheri A. Genetic susceptibility to severe course of nephropathia epidemica caused by Puumala hantavirus. *Kidney Int., 1996, vol. 49, no. 1, pp. 217–221. doi: 10.1038/ki.1996.29*
28. Nagueh S.F., Smiseth O.A., Appleton C.P., Byrd B.F., Dokainish H., Edvardsen T., Flachskampf F.A., Gillebert T.C., Klein A.L., Lancellotti P., Marino P., Oh J.K., Popescu B.A., Waggoner A.D. Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J. Am. Soc. Echocardiogr., 2016, vol. 29, no. 4, pp. 277–314. doi: 10.1016/j.echo.2016.01.011*
29. Puljiz I., Kuzman I., Markotić A., Turcinov D., Matić M., Makek N. Electrocardiografic changes in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *Scand. J. Infect. Dis., 2005, vol. 37, no. 8, pp. 594–598. doi: 10.1080/00365540510036606*
30. Rasmuson J., Lindqvist P., Soerensen K.E., Hedström M., Blomberg A., Ahlm C. Cardiopulmonary involvement in Puumala hantavirus infection. *BMC Infect. Dis., 2013, vol. 13: 501. doi: 10.1186/1471-2334-13-501*
31. Siegerink B., Rosendaal F.R., Algra A. Genetic variation in fibrinogen; its relationship to fibrinogen levels and the risk of myocardial infarction and ischemic stroke. *J. Thromb. Haemost., 2009, vol. 7, no. 3, pp. 385–390. doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.03266.x*
32. Xu G., Jin G., Fu G., Ma J., Shi Y., Tang O., Shan J. Polymorphisms in the coagulation factor VII gene and the risk of myocardial infarction in patients undergoing coronary angiography. *Chin. Med. J. (Engl)., 2003, vol. 116, no. 8, pp. 1194–1197.*

Авторы:
Манахов К.М., ассистент кафедры поликлинической терапии с курсами клинической фармакологии и профилактической медицины ФГБОУ ВО Ижевская государственная медицинская академия Минздрава России, г. Ижевск, Россия;
Сарксян Д.С., д.м.н., доцент кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ФГБОУ ВО Ижевская государственная медицинская академия Минздрава России, г. Ижевск, Россия;
Дударев М.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой поликлинической терапии с курсами клинической фармакологии и профилактической медицины ФГБОУ ВО Ижевская государственная медицинская академия Минздрава России, г. Ижевск, Россия;
Чернобровкина М.С., студентка 5 курса педиатрического факультета ФГБОУ ВО Ижевская государственная медицинская академия Минздрава России, г. Ижевск, Россия;
Прибыткова П.Ю., студентка 5 курса педиатрического факультета ФГБОУ ВО Ижевская государственная медицинская академия Минздрава России, г. Ижевск, Россия;
Филимонова С.В., студентка 6 курса лечебного факультета ФГБОУ ВО Ижевская государственная медицинская академия Минздрава России, г. Ижевск, Россия.

Authors:
Manakhov K.M., Assistant Professor, Department of Outpatient Therapy With Courses of Clinical Pharmacology and Preventive Medicine, Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Russian Federation;
Sarksyan D.S., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Department of Infectious Diseases and Epidemiology, Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Russian Federation;
Dudarev M.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Polyclinic Therapy Department with Course of Clinical Pharmacology and Preventive Medicine, Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Russian Federation;
Chernobrovkina M.S., 5th grade Student of the Pediatric Faculty, Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Russian Federation;
Pribytkova P.Yu., 5th grade Student of the Pediatric Faculty, Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Russian Federation;
Filimonova S.V., 6th grade Student of the General Medicine Faculty, Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 17.02.2021
Принята к печати 03.01.2022

Received 17.02.2021
Accepted 03.01.2022

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2022, vol. 12, no. 2, pp. 357–365

Инфекция и иммунитет
2022, Т. 12, № 2, с. 357–365

КРЫМСКАЯ ГЕМОРРАГИЧЕСКАЯ ЛИХОРАДКА В СЕВЕРО-КАВКАЗСКОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ: ОБЗОР ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ И СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДИКИ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ

Д.А. Прислегина[1,2], О.В. Малецкая[1], В.М. Дубянский[1,2], А.Е. Платонов[2]

[1] *ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия*
[2] *ФБУН Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия*

Резюме. Данная статья посвящена анализу эпидемиологической ситуации по Крымской геморрагической лихорадке (КГЛ) в субъектах Северо-Кавказского федерального округа (за период с 2005 по 2021 г.) и разработке нового подхода к совершенствованию эпидемиологического прогнозирования с использованием разрабатываемой «прогностической» модели. Исследование носит комплексный характер и проводилось с использованием эпидемиологических методов и математической статистики. Эпидемиологический анализ проведен на основе сведений из разработанных в формате проекта баз данных по заболеваемости КГЛ и карт эпидемиологического обследования очага инфекционного заболевания (ф. № 357/у). «Прогностическая» модель заболеваемости разработана на основе теоремы Байеса и последовательного статистического анализа Вальда. Расчет информативности показателей проводился по методу Кульбака. Значения климатических факторов взяты из базы данных ОИ ЦКП «ИКИ-мониторинг» Института космических исследований Российской академии наук. Полученные результаты свидетельствуют, что большинство больных КГЛ в течение исследуемого многолетнего периода были выявлены в Ставропольском крае (629) и Республике Дагестан (46). Единичные случаи отмечались в Кабардино-Балкарской Республике (2), Карачаево-Черкесской Республике (3) и Республике Ингушетия (2). Трансмиссивный механизм передачи возбудителя КГЛ (укус клеща) реализовывался преимущественно во время ухода за сельскохозяйственными животными — 59,4%. Отмечалось превалирование среднетяжелых форм заболевания (79%), геморрагические проявления (на протяжении последних пяти лет) наблюдались почти у половины заболевших. Доля верных предварительных диагнозов при госпитализации пациентов состави-

Адрес для переписки:
Прислегина Дарья Александровна
355035, Россия, г. Ставрополь, ул. Советская, 13–15,
ФКУЗ Ставропольский противочумный институт
Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (962) 448-73-57 (моб.). Тел./факс: 8 (865) 226-03-12.
E-mail: daria775@rambler.ru

Contacts:
Daria A. Prislegina
355035, Russian Federation, Stavropol, Sovetskaya str., 13–15,
Stavropol Plague Control Research Institute.
Phone: +7 (962) 448-73-57. Phone/fax: +7 (865) 226-03-12.
E-mail: daria775@rambler.ru

Для цитирования:
Прислегина Д.А., Малецкая О.В., Дубянский В.М., Платонов А.Е. Крымская геморрагическая лихорадка в Северо-Кавказском федеральном округе: обзор эпидемиологической ситуации и совершенствование методики прогнозирования заболеваемости // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 2. С. 357–365. doi: 10.15789/2220-7619-CHF-1827

Citation:
Prislegina D.A., Maletskaya O.V., Dubyanskiy V.M., Platonov A.E. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in the North Caucasian Federal District: overview of the epidemiological situation and improvement of morbidity forecasting method // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 2, pp. 357–365. doi: 10.15789/2220-7619-CHF-1827

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-75-20088 «Создание опирающейся на данные дистанционного зондирования Земли методологии анализа и прогнозирования влияния климатических и экологических факторов на заболеваемость природно-очаговыми инфекциями»), исполнители — Платонов А.Е., Дубянский В.М., Прислегина Д.А.

The study was supported by the grant from the Russian Science Foundation (project No. 19-75-20088 "Creation of a methodology for analyzing and predicting the influence of climatic and environmental factors on the incidence of natural focal infections based on Earth's remote sensing data"), conducted by Platonov A.E., Dubyanskiy V.M., Prislegina D.A.

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-CHF-1827

ла 49%. При апробации «прогностической» модели в 2021 г. на примере Ставропольского края полное точное совпадение результатов прогноза с фактическими данными получено для 11 районов (42,3%). Ложноположительные (38,5%) и завышенные (11,5%) результаты на данном этапе исследования значительно не снижают прогностическую ценность модели, поскольку зачастую отражают регистрацию произошедшего случая инфицирования по месту проживания больного в другом административном районе, гиподиагностику легких форм КГЛ в медицинских учреждениях или высокую результативность проведенных перед началом эпидемического сезона противоклещевых мероприятий в отдельных муниципальных округах. «Ложноотрицательные» результаты составили 7,7%. Таким образом, результаты проведенного анализа свидетельствуют о необходимости повышения уровня подготовки медицинского персонала для своевременного выявления больных КГЛ и усиления эффективности проводимых противоклещевых мероприятий. Результаты апробации «прогностической» модели подтверждают целесообразность и перспективность продолжения исследования.

Ключевые слова: *Крымская геморрагическая лихорадка (КГЛ), Северо-Кавказский федеральный округ, заболеваемость населения, климатические факторы, эпидемиологическая ситуация, прогнозирование заболеваемости.*

CRIMEAN-CONGO HEMORRHAGIC FEVER IN THE NORTH CAUCASIAN FEDERAL DISTRICT: OVERVIEW OF THE EPIDEMIOLOGICAL SITUATION AND IMPROVEMENT OF MORBIDITY FORECASTING METHOD

Prislegina D.A.[a,b], Maletskaya O.V.[a], Dubyanskiy V.M.[a,b], Platonov A.E.[b]

[a] *Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russian Federation*
[b] *Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation*

Abstract. This article is dedicated to analyzing epidemiological situation of Crimean-Congo hemorrhagic fever in the subjects of the North Caucasian Federal District (from 2005 to 2021) and developing a new approach to improve epidemiological forecasting by using an in-progress «prognostic» model. The study is comprehensive, using epidemiological methods and mathematical statistics. The epidemiological analysis was carried out based on information from the databases on the incidence rate for Crimean-Congo hemorrhagic fever presented as a project and maps of infectious disease focus epidemiological examination. The «prognostic» morbidity model is developed based on Bayes' theorem and Wald's sequential statistical analysis. The factors information calculation was carried out by using the Kullback method. The value of climatic factors was retrieved from the database of the Center for Collective Use "IKI-monitoring" of the Space Research Institute of the Russian Academy of Sciences. The data obtained indicate that the majority of patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever within the studied long-term period in the Stavropol Territory (629) and the Republic of Dagestan (46) were revealed. Isolated cases in the Kabardino-Balkarian Republic (2), the Karachay-Cherkess Republic (3) and the Republic of Ingushetia (2) were noted. Infection by the Crimean-Congo hemorrhagic fever causative agent via the transmission mechanism occurred mainly during the care after farm animals in 59.4%. The prevalence of moderate forms of Crimean-Congo hemorrhagic fever (79%) was noted, with hemorrhagic manifestations (over the last five years) observed almost in half of the patients. The proportion of correct preliminary diagnoses during patient hospitalization was 49%. While testing the «prognostic» model in 2021 particularly in the Stavropol Territory, a complete exact coincidence for predicted and the actual data was obtained for 11 districts (42.3%). False positive (38.5%) and overestimated (11.5%) data at this stage of the study do not significantly reduce the predictive value of the model, since they often reflect registered infection case that occurred at the patient's place of residence in another administrative region, underdiagnoses of mild forms of Crimean-Congo hemorrhagic fever in medical institutions or high efficiency of preventive measures against ticks measures carried out before the beginning of the epidemic season in individual municipal districts. False negative results were 7.7%. Thus, the results of the analysis evidence about a need to improve the training of medical personnel for the timely detection of patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever and to enhance the effectiveness of preventive measures against ticks. The results of testing the "prognostic" model confirm the feasibility and hold promise to continue the study.

Key words: *Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF), North Caucasian Federal District, incidence, climatic factors, epidemiological situation, forecasting morbidity.*

Введение

Природный очаг Крымской геморрагической лихорадки (КГЛ) на юге Европейской части Российской Федерации активизировался в 1999 г., и в настоящее время его лоймопотенциал остается высоким [1, 2, 3, 8, 9, 12, 15, 20, 21, 22]. На территории Северо-Кавказского федерального округа (СКФО) было зарегистрировано 38% от общего числа случаев этой особо опасной инфекции в стране [22]. Наибольшее число больных КГЛ всего южного региона было выявлено в Ставропольском крае (833), также заболевшие почти ежегодно регистрировались в Республике Дагестан. Циркуляция вируса Крымской-Конго геморрагической лихорад-

ки (ККГЛ) на сегодняшний день установлена во всех субъектах СКФО (кроме Республики Северная Осетия — Алания) [3, 8]. Сохранению высокой активности эпизоотического процесса КГЛ во многом способствуют благоприятные климатические условия, поддерживающие высокую численность клещей *Hyalomma marginatum* (основного переносчика и резервуара возбудителя этой инфекции) и их прокормителей [1, 2, 3, 16, 17, 18, 20]. Существующий высокий риск ухудшения эпидемической обстановки по КГЛ наряду со сложностью обеспечения научно-обоснованного планирования профилактических (в том числе акарицидных) мероприятий требуют проведения детального анализа эпидемиологических сведений и оптимизации методов составления прогноза заболеваемости, чему и посвящена настоящая статья [19].

Цель исследования — провести анализ эпидемиологической ситуации по КГЛ в субъектах СКФО (за период с 2005 по 2021 г.) и предложить новый подход к совершенствованию эпидемиологического прогнозирования КГЛ на основе использования разрабатываемой «прогностической» модели.

Материалы и методы

Эпидемиологический анализ проведен на основе сведений из разработанных в формате проекта баз данных по заболеваемости КГЛ в Ставропольском крае и Республике Дагестан. Также были использованы материалы карт эпидемиологического обследования очага инфекционного заболевания (ф. № 357/у), предоставленных управлениями Роспотребнадзора в субъектах СКФО. «Прогностическая» модель заболеваемости разработана на основе теоремы Байеса и последовательного статистического анализа Вальда. Расчет информативности показателей проводился по методу Кульбака [4, 5, 7]. Значения климатических факторов для составления прогноза взяты из базы данных ОИ ЦКП «ИКИ-мониторинг» Института космических исследований РАН.

Результаты

По сравнению со снижением заболеваемости КГЛ в 2020 г., связанным, вероятнее всего, с введением ограничительных мер по недопущению распространения COVID-19, число выявленных случаев в текущем году возросло в 3 раза [10] (рис. 1). Заболевшие были зарегистрированы в трех субъектах региона.

Всего с 2005 по 2021 г. на территории СКФО было выявлено 682 больных КГЛ, из них 92,2% — в Ставропольском крае. Множественные случаи заболевания в данном субъекте регистрировались ежегодно, летальность составила 1,4% (рис. 2).

Проявления эпидемического процесса отмечались на территории 25 из 26 административных районов. Однако больше половины заболевших (59,3%) были выявлены в северных и восточных округах края (Апанасенковском, Арзгирском, Ипатовском, Красногвардейском, Нефтекумском и Туркменском), характеризующихся наиболее высокой активностью эпизоотического процесса КГЛ [14, 21, 22].

В Республике Дагестан в течение исследуемого периода регистрировалась преимущественно спорадическая заболеваемость (рис. 3).

Было выявлено 46 случаев КГЛ (3 — с летальным исходом). Рост числа больных отмечался в 2019 г. (13) и 2021 г. (7), превысив среднемноголетние показатели в 6,2 и 2,5 раза соответственно (рис. 2). Два случая явля-

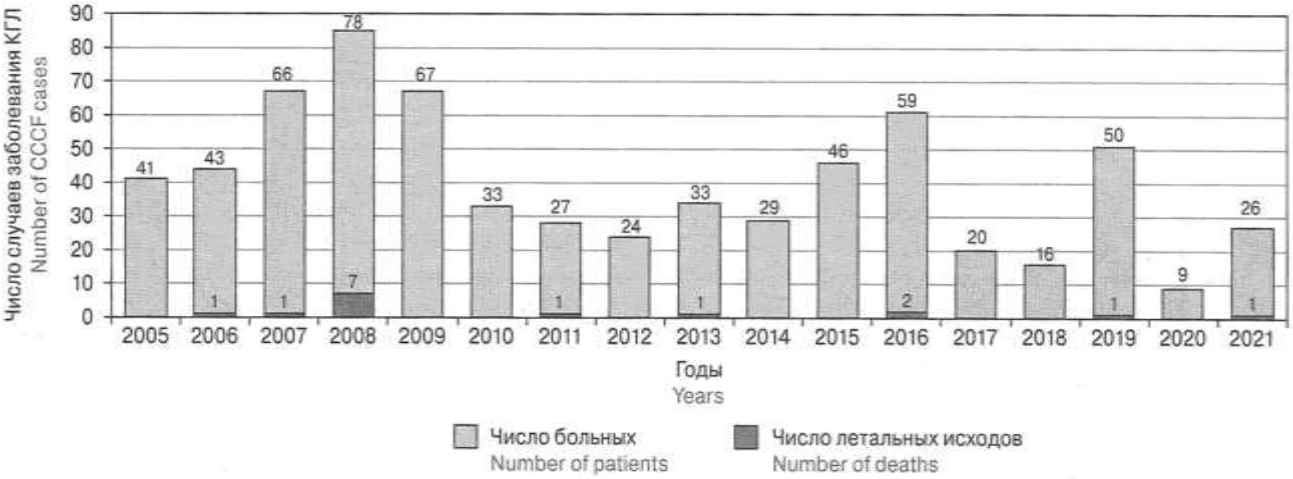

Рисунок 1. Число выявленных случаев заболевания КГЛ в Северо-Кавказском федеральном округе с 2005 по 2021 г.

Figure 1. 2005–2021 CCHF prevalence in the North Caucasian Federal District

Рисунок 2. Динамика заболеваемости КГЛ в Ставропольском крае с 2005 по 2021 г.
Figure 2. The dynamics of 2005–2021 CCHF incidence rate in the Stavropol Territory

лись завозными: в 2013 г. из Ростовской области (где, по месту постоянного проживания, и произошло инфицирование заболевшей) и в 2019 г. из Азербайджана. Больные регистрировались на территории 16 административных районов (большинство в Кизлярском районе и г. Махачкале — по 12 человек).

На территории Кабардино-Балкарской Республики случай заболевания местного жителя (летальный) был выявлен в 2016 г. в Зольском районе. В 2021 г. диагноз был лабораторно подтвержден у прибывшего в республику с клиническими симптомами заболевания жителя Карачаево-Черкесской Республики (КЧР).

В КЧР было зарегистрировано три завозных случая инфекции (из Ставропольского края) — в Малокарачаевском (2007–2008 гг.) и Карачаевском (2015 г.) районах.

В Республике Ингушетия двое больных (с летальным исходом заболевания) были выявлены в 2007–2008 гг. — на территории г. Сунжа и Малгобекского района соответственно.

Результаты анализа возрастного состава заболевших свидетельствуют о вовлечении в эпидемический процесс лиц всех возрастных групп (с преобладанием взрослого трудоспособного населения — 81,4%). Дети (до 14 лет) в Ставропольском крае составили 2,1%, в Республике Дагестан — 10,9% (в том числе ребенок раннего возраста — 2,5 лет).

По данным эпидемиологического анамнеза, реализация трансмиссивного механизма передачи вируса ККГЛ во всех субъектах СКФО преимущественно происходила во время ухода за сельскохозяйственными животными — на личном подворье или в связи с профессиональной деятельностью (43 и 16,4% соответственно). Контакт с клещом также отмечался при выполнении полевых работ (22%), во время отдыха или работы в природном биотопе (14,1%). Заражение четырех больных произошло во время убоя скота и разделки туш при контакте с кровью и тканями животных. Кроме того, было зафиксировано четыре случая внутри-

Рисунок 3. Динамика заболеваемости КГЛ в Республике Дагестан с 2005 по 2021 г.
Figure 3. The dynamics of 2005–2021 CCHF incidence rate in the Republic of Dagestan

больничного гемоконтактного инфицирования медицинского персонала. В Ставропольском крае в 2008 г. произошло заражение хирурга и анестезиолога при оказании медицинской помощи пациенту с выраженным геморрагическим синдромом, в 2016 г. — медицинской сестры в результате укола кисти руки иглой от катетера после внутривенной инъекции. В Республике Дагестан в 2021 г. зарегистрирован случай заболевания у медицинской сестры после контакта с кровью больного КГЛ (во время установки системы для внутривенного введения лекарственных препаратов) без повреждения ее кожных покровов.

Проведенный анализ сроков обращения больных КГЛ за медицинской помощью показал, что более половины пациентов (62,5%) обращались в медицинские учреждения в первые трое суток от появления первых симптомов заболевания (из них 92,3% — в первые сутки). Этот факт свидетельствует о достаточной настороженности населения в отношении КГЛ. Но только для 49% из общего числа заболевших при первичном обращении за медицинской помощью был поставлен верный предварительный диагноз. Среди неверных предварительных диагнозов, с которыми пациенты поступали в стационар, преобладали «ОРВИ» (28,6%), «ОРВИ. Токсико-аллергическая реакция на укус клеща» (13%) и «Острая кишечная инфекция» (4,5%). Также в единичных случаях были поставлены предварительные диагнозы «Острый аппендицит», «Острый пиелонефрит», «Угрожающий аборт», «Ушиб голени», «Корь» и «Дисциркуляторная энцефалопатия». Таким образом, своевременное выявление больных с подозрением на КГЛ (на основании эпидемиологических данных и клинических проявлений) по-прежнему представляет определенные трудности для медицинских работников первичного звена здравоохранения во всех субъектах региона.

Результаты анализа клинических данных свидетельствуют, что на протяжении всего исследуемого периода в большинстве случаев отмечалось среднетяжелое течение КГЛ (79%) без геморрагического синдрома, тяжелые формы составили 16,9%. Вместе с тем на протяжении последних пяти лет геморрагические проявления наблюдались почти у половины заболевших (в 2017–2018 гг. — у 50%, в 2019 г. — у 41,2%, в 2020 г. — у 88,9%, в 2021 г. — у 33,3%). Значимых отличий по частоте преобладания различных клинических форм КГЛ в Ставропольском крае и Республике Дагестан не было обнаружено.

Учитывая сохранение напряженной эпидемиологической ситуации по КГЛ на территории СКФО, разработка и совершенствование методов эпидемиологического прогнозирования как основы для последующего научно-обоснованного планирования профилактических мероприятий является важной задачей. Ранее авторами статьи была предложена риск-ориентированная методика прогнозирования заболеваемости КГЛ (на примере Ставропольского края) [6, 13, 14]. Для составления прогноза использовались числовые значения основных факторов, влияющих на эпидемический и эпизоотический процессы этой инфекции, — биотических, природно-климатических и социальных [6, 8, 13, 14, 16, 18, 23, 24, 25, 26]. Точность методики при апробации на ретроспективных данных за 2013–2017 гг. и проверке в 2018 г. составила от 90,6 до 81,2% [13, 14]. Для совершенствования данного метода прогнозирования и повышения точности получаемых результатов нами разрабатывается «прогностическая» модель динамики заболеваемости КГЛ. Предлагаемый новый подход к прогнозированию принципиально отличается:

– заменой «абсолютных» значений числа больных на относительные показатели заболеваемости;
– добавлением «временного аспекта» – анализ климатических факторов по каждому административному району с определением их информативности проведен не за предшествующий эпидемический сезон, а за длительный период (15 лет).

Кроме того, был расширен перечень используемых гидрометеорологических и экологических данных. Помимо среднемесячных значений температуры воздуха (°C), относительной влажности воздуха (%), количества выпавших осадков (мм), высоты снежного покрова (см) и скорости ветра (м/с) мы добавили новые факторы, также оказывающие (согласно литературным источникам) значительное влияние на жизнедеятельность клещей *H. marginatum* [6, 8, 13, 14, 16, 18, 23, 24, 25, 26]:

– максимальную и минимальную температуру воздуха (°C);
– температуру почвы на глубине 10 и 40 см (°C);
– влажность почвы на глубине 10 и 40 см (%);
– глубину снега (см);
– долю площади, покрытой снегом (см);
– атмосферное давление (мбар);
– нормализованный вегетационный индекс (NDVI, отн. ед.).

Расчеты проводили в ранее разработанной программе по аналогичному алгоритму [6, 13, 14]. В качестве пороговых величин использовали число 0,000009 (соответствовало отсутствию больных — меньше относительного показателя заболеваемости 1 случай на 100 тыс. населения) и автоматически рассчитанных значений медианы (0,9), среднего (3,5) и третьего квартиля (4,7).

Таблица. Результаты апробации «прогностической» модели динамики заболеваемости КГЛ на 2021 г. (на примере Ставропольского края)

Table. Results of testing the "prognostic" model for 2021 CCHF morbidity dynamics (on the example of the Stavropol Territory)

№ No.	Административный район Administrative region	Результат прогноза Forecast result	Фактическая заболеваемость (на 100 тыс. населения) Actual morbidity (per 100 000 population)	Трактовка результата Result interpretation
1	**Александровский** Alexandrovsky	≤ 0,000009	0	**Верный** Correct
2	**Андроповский** Andropovsky	≤ 0,000009	0	**Верный** Correct
3	**Апанасенковский** Apanasenkovsky	>> 4,7	10,1	**Верный** Correct
4	**Арзгирский** Arzgirsky	> 4,7	8,3	**Верный** Correct
5	**Благодарненский** Blagodarnensky	> 4,7	5,2	**Верный** Correct
6	**Буденновский** Budennovsky	> 4,7	0	**Ложноположительный** False positive
7	**Георгиевский** Georgievsky	> 0,9	0	**Ложноположительный** False positive
8	**Грачевский** Grachevsky	≤ 0,000009	2,7	**Ложноотрицательный** False negative
9	**Изобильненский** Izobilnensky	> 4,7	0	**Ложноположительный** False positive
10	**Ипатовский** Ipatovsky	> 4,7	5,4	**Верный** Correct
11	**Кировский** Kirovsky	≤ 0,000009	0	**Верный** Correct
12	**Кочубеевский** Kochubeevsky	≤ 0,000009	0	**Верный** Correct
13	**Красногвардейский** Krasnogvardeisky	> 4,7	5,4	**Верный** Correct
14	**Курский** Kursky	> 4,7	0	**Ложноположительный** False positive
15	**Левокумский** Levokumsky	> 4,7	0	**Ложноположительный** False positive
16	**Минераловодский** Mineralovodsky	≤ 0,000009	0	**Верный** Correct
17	**Нефтекумский** Neftekumsky	> 4,7	1,6	**Завышенный** Overstated
18	**Новоалександровский** Novoaleksandrovsky	> 4,7	0	**Ложноположительный** False positive
19	**Новоселицкий** Novoselitsky	> 4,7	0	**Ложноположительный** False positive
20	**Петровский** Petrovsky	> 4,7	1,4	**Завышенный** Overstated
21	**Предгорный** Predgorny	≤ 0,000009	0	**Верный** Correct
22	**Советский** Sovietsky	> 4,7	0	**Ложноположительный** False positive
23	**Степновский** Stepnovsky	> 4,7	0	**Ложноположительный** False positive
24	**Труновский** Trunovsky	> 4,7	3,4	**Завышенный** Overstated
25	**Туркменский** Turkmensky	> 4,7	0	**Ложноположительный** False positive
26	**Шпаковский** Shpakovsky	≤ 0,000009	1,3	**Ложноотрицательный** False negative

Результаты апробации модели для составления прогноза по каждому административному району Ставропольского края на 2021 г. представлены в табл.

Полное точное совпадение результатов прогноза с фактическими данными получено для 11 районов (42,3%). Ложноположительные (38,5%) и завышенные (11,5%) результаты на данном этапе исследования значительно не снижают прогностическую ценность модели, поскольку зачастую отражают регистрацию произошедшего случая инфицирования по месту проживания больного в другом административном районе, гиподиагностику легких форм КГЛ в медицинских учреждениях или высокую результативность проведенных перед началом эпидемического сезона противоклещевых мероприятий в отдельных муниципальных округах [6, 13, 14, 21, 22]. Низкое количество «ложноотрицательных» результатов (2 (7,7%); эти случаи заболевания в 2021 г. могли быть завозными с территории других районов или «непрогнозируемыми», поскольку в Грачевском и Шпаковском районах в прошлые годы могли иметь место недиагностированные случаи КГЛ без проявлений геморрагического синдрома) также свидетельствует в пользу надежности разрабатываемой модели и перспективности продолжения ее дальнейшего совершенствования.

Заключение

Таким образом, КГЛ на сегодняшний день по-прежнему представляет серьезную угрозу для здоровья населения СКФО. Высокая частота случаев заражения при уходе за сельскохозяйственными животными и выполнении полевых работ может косвенно свидетельствовать о недостаточной эффективности проводимых акарицидных и противоклещевых обработок скота, пастбищ и природных биотопов. Низкий процент верных предварительных диагнозов наряду с высокой частотой геморрагических форм у заболевших КГЛ в течении последних пяти лет и выявлением внутрибольничных случаев заражения медицинских работников подтверждают необходимость повышения уровня настороженности медицинского персонала в отношении этой особо опасной инфекции. Ежегодная регистрация больных в Ставропольском крае и Республике Дагестан с вовлечением в эпидемический процесс детей, а также возникновение спорадических (в том числе завозных) случаев в других республиках требуют уделять особое внимание проведению профилактических мероприятий и обеспечению повышенной готовности медицинского персонала и лечебных учреждений для своевременного оказания квалифицированной помощи больным КГЛ в каждом субъекте региона. Успешному решению указанных задач во многом будет способствовать оптимизация методик составления эпидемиологического прогноза, в том числе с использованием разрабатываемой авторами «прогностической» модели. Результаты, полученные при апробации модели в 2021 г. (на примере Ставропольского края), свидетельствуют о целесообразности и перспективности продолжения данного исследования.

Список литературы/References

1. Василенко Н.Ф., Манин Е.А., Малецкая О.В., Волынкина А.С., Прислегина Д.А., Семенко О.В., Куличенко А.Н. Современное состояние природного очага Крымской геморрагической лихорадки в Российской Федерации // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2019. № 4. С. 46–52. [Vasilenko N.F., Manin E.A., Maletskaya O.V., Volynkina A.S., Prislegina D.A., Semenko O.V., Kulichenko A.N. The modern condition of Crimean-Congo haemorrhagic fever natural focus in the Russian Federation. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i mmunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 2019, no. 4, pp. 46–52. (In Russ.)*] *doi: 10.36233/0372-9311-2019-4-46-52*
2. Волынкина А.С., Котенев Е.С., Лисицкая Я.В., Малецкая О.В., Шапошникова Л.И., Куличенко А.Н. Эпидемиологическая ситуация по крымской геморрагической лихорадке в Российской Федерации в 2016 г., прогноз на 2017 г. // Проблемы особо опасных инфекций. 2017. № 1. С. 24–28. [Volynkina A.S., Kotenev E.S., Lisitskaya Ya.V., Maletskaya O.V., Shaposhnikova L.I., Kulichenko A.N. Epidemiological situation on Crimean hemorrhagic fever in the Russian Federation in 2016, and prognosis for 2017. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections, 2017, no. 1, pp. 24–28. (In Russ.)*] *doi: 10.21055/0370-1069-2017-1-24-28*
3. Волынкина А.С., Малецкая О.В., Скударева О.Н., Тищенко И.В., Василенко Е.И., Лисицкая Я.В., Шапошникова Л.И., Колосов А.В., Ростовцева Д.В., Василенко Н.Ф., Дубянский В.М., Прислегина Д.А., Яцменко Е.В., Куличенко А.Н. Анализ эпидемиологической ситуации по Крымской геморрагической лихорадке в Российской Федерации в 2020 г. и прогноз на 2021 г. // Проблемы особо опасных инфекций. 2021. № 1. С. 17–22. [Volynkina A.S., Maletskaya O.V., Skudareva O.N., Tishchenko I.V., Vasilenko E.I., Lisitskaya Ya.V., Shaposhnikova L.I., Kolosov A.V., Rostovtseva D.V., Vasilenko N.F., Dubyansky V.M., Prislegina D.A., Yatsmenko E.V., Kulichenko A.N. Analysis of epidemiological situation on Crimean hemorrhagic fever in the Russian Federation in 2020 and prognosis for 2021. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections, 2021, no. 1, pp. 17–22. (In Russ.)*] *doi: 10.21055/0370-1069-2021-1-17-22*
4. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. Л.: Медицина, 1978. 294 с. [Gubler E.V. Computational methods for analysis and identification of pathological processes. *Leningrad: Medicine, 1978. 294 p. (In Russ.)*]

5. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. Л.: Медицина, 1973. 141 с. [Gubler E.V., Genkin A.A. Application of statistical non-parametric criteria in medico-biological investigations. *Leningrad: Medicine, 1973. 141 p. (In Russ.)*]
6. Дубянский В.М., Прислегина Д.А., Куличенко А.Н. Риск-ориентированная модель прогнозирования эпидемиологической ситуации по Крымской геморрагической лихорадке (на примере Ставропольского края) // Анализ риска здоровью. 2018. № 1. С. 13–21. [Dubyanskiy V.M., Prislegina D.A., Kulichenko A.N. Risk-oriented model for predicting epidemiological situation with Crimean-Congo hemorrhagic fever (on the example of Stavropol region). *Analiz riska zdorov'yu = Health Risk Analysis, 2018, no. 1, pp. 13–21. (In Russ.)*]
7. Дубянский М.А., Кенжебаев А., Степанов В.М., Асенов Г.А., Дубянская Л.Д. Прогнозирование эпизоотической активности чумы в Приаралье и Кызылкумах. Нукус: Каракалпакстан, 1992. 240 с. [Dubyanskiy M.A., Kenzhebaev A., Stepanov V.M., Asenov G.A., Dubyanskaia L.D. Prognostication of plague epizootic activity in Sub-Aral and Kyzylkum Areas. *Nukus: Karakalpakstan, 1992. 240 p. (In Russ.)*]
8. Куличенко А.Н., Прислегина Д.А. Крымская геморрагическая лихорадка: климатические предпосылки изменений активности природного очага на юге Российской Федерации // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 1. С. 162–172. [Kulichenko A.N., Prislegina D.A. Climatic prerequisites for changing activity in the natural Crimean-Congo hemorrhagic fever focus in the South of the Russian Federation. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 162–172. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-162-172*
9. Малецкая О.В., Таран Т.В., Прислегина Д.А., Дубянский В.М., Волынкина А.С., Семенко О.В., Василенко Н.Ф., Тарасов М.А., Цапко Н.В. Природно-очаговые вирусные лихорадки на юге европейской части России. Крымская геморрагическая лихорадка // Проблемы особо опасных инфекций. 2020. № 4. С. 75–80. [Maletskaya O.V., Taran T.V., Prislegina D.A., Dubyansky V.M., Volynkina A.S., Semenko O.V., Vasilenko N.F., Tarasov M.A., Tsapko N.V. Natural-focal viral fevers in the South of the European part of Russia. Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections, 2020, no. 4, pp. 75–80. (In Russ.)*] *doi: 10.21055/0370-1069-2020-4-75-80*
10. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году: государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2021. 256 с. [On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2020: state report. *Moscow: Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 2021. 256 p. (In Russ.)*]
11. Онищенко Г.Г., Ефременко В.И., Бейер А.П. Крымская геморрагическая лихорадка. М.: ГОУ ВУНМЦ, 2005. 269 с. [Onishchenko G.G., Efremenko V.I., Beyer A.P. Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Moscow: All Russian Educational Research Center for Continuing Medical and Pharmaceutical Education, 2005. 269 p. (In Russ.)*]
12. Платонов А.Е., Авксентьев Н.А., Авксентьева М.В., Деркач Е.В., Платонова О.В., Титков А.В., Колясникова Н.М. Социально-экономическое бремя пяти природно-очаговых инфекций в Российской Федерации // Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология. 2015. Т. 8, № 1. С. 47–56. [Platonov A.E., Avksentyev N.A., Avksentyeva M.V., Derkach E.V., Platonova O.V., Titkov A.V., Kolyasnikova N.M. Social and economic burden of five natural focal infections in the Russian Federation. *Sovremennaya farmakoekonomika i farmakoepidemiologiya = Modern Pharmacoeconomics and Pharmacoepidemiology, 2015, vol. 8, no. 1, pp. 47–56. (In Russ.)*] *doi: 10.17749/2070-4909.2015.8.1.047-056*
13. Прислегина Д.А., Дубянский В.М., Куличенко А.Н. Особо опасные арбовирусные лихорадки на юге России: совершенствование мониторинга с применением современных информационных технологий // Медицина труда и экология человека. 2019. № 4. С. 50–58. [Prislegina D.A., Dubyanskiy V.M., Kulichenko A.N. Particular dangerous arbovirus fevers in the south of Russia: improvement of monitoring with modern information technology application. *Meditsina truda i ekologiya cheloveka = Occupational Health and Human Ecology, 2019, no. 4, pp. 50–58. (In Russ.)*] *doi: 10.24411/2411-3794-2019-10047*
14. Прислегина Д.А., Дубянский В.М., Малецкая О.В., Куличенко А.Н., Василенко Н.Ф., Манин Е.А., Ковальчук И.В. Крымская геморрагическая лихорадка в Ставропольском крае: современные клинико-эпидемиологические аспекты и новый подход к прогнозированию заболеваемости // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2018. № 3. С. 49–56. [Prislegina D.A., Dubyanskiy V.M., Maletskaya O.V., Kulichenko A.N., Vasilenko N.F., Manin E.A., Kovalchuk I.V. Crimean-Congo hemorrhagic fever in the Stavropol region: contemporaryclinical and epidemiological aspects and new approach to forecasting of morbidity. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie = Infectious Diseases: News, Opinions, Training, 2018, no. 3, pp. 49–56. (In Russ.)*] *doi: 10.24411/2305-3496-2018-13007*
15. Смирнова С.Е. Крымская-Конго геморрагическая лихорадка (этиология, эпидемиология, лабораторная диагностика). М.: Академия труда и социальных отношений, 2007. 304 с. [Smirnova S.E. Crimean-Congo hemorrhagic fever (etiology, epidemiology, laboratory diagnostics). *Moscow: Academy of Labour and Social Relations, 2007. 304 p. (In Russ.)*]
16. Тохов Ю.М., Дегтярев Д.Ю., Дубянский В.М. Иксодовые клещи (морфология, медицинское значение, регуляция численности). Ставрополь: ИП Светличная С.Г., 2015. 84 с. [Tokhov Yu.M., Degtyarev D.Yu., Dubyanskiy V.M. Ixodid ticks (morphology, medical significance, population regulation). *Stavropol: S.G. Svetlichnaya Individual Entrepreneur, 2015. 84 p. (In Russ.)*]
17. Тохов Ю.М., Чумакова И.В., Луцук С.Н., Дьяченко Ю.В., Котенев Е.С., Зайцев А.А. Иксодовые клещи — резервуар возбудителей инфекционных и инвазионных болезней на территории Ставропольского края // Вестник ветеринарии. 2013. № 2. С. 19–21. [Tokhov Yu.M., Chumakova I.V., Lutsuk S.N., Dyachenko Yu.V., Kotenev E.S., Zaitsev A.A. Ticks as the reservoir of contagious diseases in the Stavropol territory. *Vestnik veterinarii = Herald of Veterinary Science, 2013, no. 2, pp. 19–21. (In Russ.)*]
18. Трухачев В.И., Тохов Ю.М., Луцук С.Н., Дылев А.А., Толоконников В.П., Дьяченко Ю.В. Распространение и экологическая характеристика иксодовых клещей рода Hyalomma в экосистемах Ставропольского края // Юг России: экология, развитие. 2016. Т. 11, № 2. С. 59–69. [Trukhachev V.I., Tokhov Yu.M., Lutsuk S.N., Dylev A.A., Tolokonnikov V.P., Dyachenko Yu.V. Distribution and ecological characteristics of Hyalomma ixodid ticks in the ecosystems of the Stavropol region. *Iug Rossii: ekologiia, razvitie = South of Russia: Ecology, Development, 2016, vol. 11, no. 2, pp. 59–69. (In Russ.)*] *doi: 10.18470/1992-1098-2016-2-59-69*

19. Черкасский Б.Л. Риск в эпидемиологии. М.: Практическая медицина, 2007. 480 с. [Cherkasskii B.L. Risk in epidemiology. *Moscow: Practical Medicine, 2007. 480 p. (In Russ.)*]
20. Шестопалов Н.В., Шашина Н.И., Германт О.М., Пакскина Н.Д., Царенко В.А., Веригина Е.В., Бойко Л.С. Информационное письмо «Природно-очаговые инфекции, возбудителей которых передают иксодовые клещи, и их неспецифическая профилактика в Российской Федерации (по состоянию на 01.01.2019)» // Дезинфекционное дело. 2019. № 1 (107). С. 37–44. [Shestopalov N.V., Shashina N.I., Germant O.M., Pakskina N.D., Tsarenko V.A., Verigina E.V., Boyko L.S. Information letter "Natural and focal infections, which agents are passed by ixodic ticks, and their nonspecific preventive measures in the Russian Federation (according to 01.01.2019)". *Dezinfektsionnoe delo = Disinfection Affairs, 2019, no. 1 (107), pp. 37–44. (In Russ.)*]
21. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекционным болезням в Южном и Северо-Кавказском федеральных округах в 2019 г.: аналитический обзор / Сост. А.Н. Куличенко, О.В. Малецкая, Д.А. Прислегина, Н.Ф. Василенко, О.В. Семенко, А.Ю. Газиева, У.М. Ашибоков. Ставрополь, 2020. 96 с. [Epidemiological situation on natural focal infectious diseases in the Southern and North Caucasian federal districts in 2019. Analytical review. Ed. by A.N. Kulichenko, O.V. Maletskaya, D.A. Prislegina, N.F. Vasilenko, O.V. Semenko, A.Yu. Gaziyeva, U.M. Ashibokov. *Stavropol, 2020. 96 p. (In Russ.)*]
22. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекционным болезням в Южном и Северо-Кавказском федеральных округах в 2020 г.: аналитический обзор / Сост. А.Н. Куличенко, О.В. Малецкая, Д.А. Прислегина, В.В. Махова, Т.В. Таран, Н.Ф. Василенко, У.М. Ашибоков. Ставрополь, 2021. 91 с. [Epidemiological situation on natural focal infectious diseases in the Southern and North Caucasian federal districts in 2020: analytical review. Ed. by A.N. Kulichenko, O.V. Maletskaya, D.A. Prislegina, V.V. Makhova, T.V. Taran, N.F. Vasilenko, U.M. Ashibokov. *Stavropol, 2021. 91 p. (In Russ.)*]
23. Ansari H., Shahbaz B., Izadi S., Zeinali M., Tabatabaee S.M., Mahmoodi M., Holakouie Naieni K., Mansournia M.A. Crimean-Congo hemorrhagic fever and its relationship with climate factors in southeast Iran: a 13-year experience. *J. Infect. Dev. Ctries., 2014, vol. 8, no. 6, pp. 749–757. doi: 10.3855/jidc.4020*
24. Mostafavi E., Chinikar S., Bokaei S., Haghdoost A. Temporal modeling of Crimean-Congo hemorrhagic fever in eastern Iran. *Int. J. Infect. Dis., 2013, vol. 17, no. 7, pp. 524–528. doi: 10.1016/j.ijid.2013.01.010*
25. Vescio F.M., Busani L., Mughini-Gras L., Khoury C., Avellis L., Taseva E., Rezza G., Christova I. Environmental correlates of Crimean-Congo haemorrhagic fever incidence in Bulgaria. *BMC Public Health, 2012, no. 12: 1116. doi: 10.1186/1471-2458-12-1116*
26. Yigit G.K. An example of tick-Crimean Congo hemorrhagic fever (CCHF) in Eflani district, Karabuk, Turkey. *Scientific Research and Essays, 2011, vol. 6, no. 11, pp. 2395–2402. doi: 10.5897/SRE11.574*

Авторы:

Прислегина Д.А., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории эпидемиологии ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия; член временного научного коллектива по выполнению гранта РНФ ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Малецкая О.В., д.м.н., профессор, зам. директора по научной и противоэпидемической работе ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

Дубянский В.М., д.б.н., зав. отделом эпизоотологического мониторинга и прогнозирования ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия; член временного научного коллектива по выполнению гранта РНФ ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Платонов А.Е., д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории эпидемиологии природно-очаговых инфекций ФБУН Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия.

Authors:

Prislegina D.A., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Epidemiology, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russian Federation; Member of the Temporary Research Team for the Implementation of the Grant of the Russian Science Foundation, Central Research Institute of Epidemiology, Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow, Russian Federation;

Maletskaya O.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director for Scientific and Anti-Epidemic Work, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russian Federation;

Dubyanskiy V.M., PhD, MD (Biology), Head of the Department of Epizootological Monitoring and Prognostication, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russian Federation; Member of the Temporary Research Team for the Implementation of the Grant of the Russian Science Foundation, Central Research Institute of Epidemiology, Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow, Russian Federation;

Platonov A.E., PhD, MD (Biology), Professor, Head Researcher, Laboratory of Zoonoses, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 21.11.2021
Принята к печати 07.12.2021

Received 21.11.2021
Accepted 07.12.2021

ЭНТЕРОКОЛИТ, ВЫЗВАННЫЙ CLOSTRIDIUM DIFFICILE: КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПАЦИЕНТОВ ИНФЕКЦИОННОЙ КЛИНИКИ г. ВАРНЫ, БОЛГАРИЯ

Е.Д. Люцова, М.Д. Господинова

Медицинский университет им. профессора Параскева Стоянова, г. Варна, Болгария

Резюме. *Введение.* Ассоциированные с *Clostridium difficile* инфекции (CDI) продолжают оставаться угрозой глобальному здравоохранению. На сегодняшний день отсутствует унифицированный подход к диагностике и определению степени тяжести данных инфекций несмотря на высокую актуальность проблемы во всем мире. Цель нашего исследования — определение факторов риска CDI, изучение клинико-эпидемиологических особенностей течения инфекции и возможности использования шкалы ATLAS для оценки степени ее тяжести. *Материалы и методы.* Было проведено клинико-эпидемиологическое исследование 36 пациентов с диагнозом CDI, госпитализированных в инфекционную клинику г. Варны в период с января 2018 г. по июнь 2019 г. Этиологический диагноз был поставлен с помощью иммунохроматографического метода, для оценки степени тяжести течения CDI была использована шкала ATLAS. *Результаты и обсуждение.* Больные энтероколитом, вызванным *Clostridium difficile*, занимают 3,3% в структуре больных кишечными инфекциями, зарегистрированных в инфекционной клинике г. Варны в период с января 2018 г. по июнь 2019 г. Средний возраст обследуемых пациентов составлял 69,8±16,4 лет, 92% из них были женского пола, а 6% — мужского. Были установлены следующие факторы риска развития CDI: коморбидность — у 32 (88,89%) пациентов, предшествующие госпитализации — у 19 (52,78%), антибактериальное лечение, предшествующее развитию диареи, — у 31 (86,11%). У 24 (66,67%) пациентов заболевание протекало в легкой форме (ATLAS от 0 до 4 баллов), а у 12 (33,33%) — в среднетяжелой форме. Случаи тяжелого течения или летального исхода не наблюдались. Наиболее характерными симптомами заболевания были лихорадка, диарея и боли в животе. Проведенное лечение отвечало нормам действующих национальных и международных рекомендаций: 11 (30,56%) пациентам была назначена монотерапия пероральным медикаментом метронидазолом, 12 (33,33%) — монотерапия пероральным антибиотиком ванкомицином, а остальным 13 (36,11%) — пероральная комбинация из двух антибиотиков. *Выводы.* Пациенты из групп риска с симптомами энтероколита и данными из анамнеза об употреблении антибиотиков или наличии госпитализаций должны проходить исследование на наличие токсинообразующих штаммов *Clostridium difficile*. Диагностическая точность выявления CDI может быть повышена с помощью использования двухфазового протокола, предложенного Европейским центром по профилактике и контролю инфекционных заболеваний (ECDC), а выбор оптимальной тактики лечения может быть улучшен с помощью использования шкалы ATLAS.

Ключевые слова: *Clostridium difficile, CDI, энтероколит, факторы риска, коморбидность, ATLAS.*

Адрес для переписки:
Люцова Екатерина Дмитриевна
9000, Болгария, г. Варна, ул. Цар Освободител, 100,
Медицинский университет им. профессора Параскева Стоянова.
Тел.: +359 52978710.
E-mail: evalkova83@gmail.com

Contacts:
Ekaterina D. Lyutsova
9000, Bulgaria, Varna, Tsar Osvoboditel str., 100, Medical University Prof. Dr. Paraskev Stoyanov.
Phone: +359 52978710.
E-mail: evalkova83@gmail.com

Для цитирования:
Люцова Е.Д., Господинова М.Д. энтероколит, вызванный Clostridium difficile: клинико-эпидемиологическое исследование пациентов инфекционной клиники г. Варны, Болгария // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 2. С. 366–372. doi: 10.15789/2220-7619-TEA-1669

Citation:
Lyutsova E.D., Gospodinova M.D. The epidemiological and clinical study of patients with Clostridium difficile enterocolitis in Varna, Bulgaria // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 2, pp. 366–372. doi: 10.15789/2220-7619-TEA-1669

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-TEA-1669

THE EPIDEMIOLOGICAL AND CLINICAL STUDY OF PATIENTS WITH *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* ENTEROCOLITIS IN VARNA, BULGARIA

Lyutsova E.D., Gospodinova M.D.

Medical University Prof. Dr. Paraskev Stoyanov, Varna, Bulgaria

Abstract. *Introduction. Clostridium difficile* infections (CDI) remain a global health concern. Currently, no unified approach to the diagnostics and determining severity of these infections despite their high urgency throughout the world was proposed. The aim of the study is to identify risk factors for CDI, investigate clinical and epidemiological features of the disease course and potential for using the ATLAS scale to assess its severity. *Materials and methods.* 36 CDI patients hospitalized at the Infectious Disease Clinic of Varna were analyzed during the period from January 2018 until June 2019. Clinical and epidemiologic study was conducted. The diagnosis was made by using a rapid immunochromatographic test; CDI patient stratification was performed by ATLAS scoring system. *Results and discussion.* Within the aforementioned period, 1100 patients were hospitalized at the Infectious Disease Clinic of Varna, and CDIs were reported in 3,3% of cases. The most affected were elderly individuals (the mean age was 69,8±16,4 years old) most of whom were females (92%) with only 6% of males. The following risk factors were investigated: comorbidities — 32 patients (88,89%), recent hospitalization — 19 patients (52,78%), antibiotic use — 31 patients (86,11%). Twenty-four patients (66,67%, ATLAS score ≤ 4 points) had mild CDI, whereas moderate form of CDI was observed in 12 patients (33,33%). No severe CDI or death were observed. The characteristic clinical presentation included fever, diarrhea and abdominal cramping. The treatment was implemented according to the national and international recommendations by using oral Metronidazole for 11 patients (30,56%), Vancomycin — for 12 patients (33,33%), or both — for 13 patients (36,11%). *Conclusion.* Patients at risk with symptoms of enterocolitis and a history of antibiotic use or hospitalizations should be screened for the presence of toxin-forming strains of *Clostridium difficile*. According to the European Centre for Disease Prevention (ECDC) the diagnostic yield of CDI may be increased by using two-step protocol, whereas the ATLAS score system may be a useful tool for routine evaluation of patients with CDI.

Key words: *Clostridium difficile, CDI, enterocolitis, risk factors, comorbidities, ATLAS.*

Введение

Актуальность и значимость ассоциированных с *Clostridium difficile* инфекций (CDI) продолжает нарастать во всем мире. В последее десятилетие в мире наблюдается рост инфекционных диарей, являющихся следствием CDI. В 2011 г. в США было зарегистрировано 453 000 случая CDI, из которых 29 300 закончились летально [14]. В Европе в 2016 г. было зарегистрировано 7711 случаев CDI [8], при этом ежегодно около 40 000 случаев остаются недиагностированными из-за отсутствия стандартизированных подходов к диагностике и контролю за данной инфекцией в европейских странах [5]. *Clostridium difficile* — грамположительный анаэроб, высокорезистентные споры которого способны выживать годами на объектах окружающей среды, проявляя слабую чувствительность к высушиванию, термической и химической дезинфекции [2]. CDI варьируют между асимптоматическим носительством, диареей различной степени тяжести, псевдомембранозным колитом и токсическим мегаколоном [8]. Согласно последним исследованиям, факторами риска развития CDI являются старческий возраст, коморбидность, госпитализации, использование антибиотиков, ингибиторов протонной помпы и некоторых других медикаментов [9]. Вопреки актуальности проблемы CDI, терапевтический подход к ее решению ограничен отменой медикаментов, доведших до развития диарейного эпизода, и назначением антиклостридийного антибиотика. Его выбор зависит от степени тяжести CDI [15]. В данный момент отсутствуют унифицированные и точные оценочные шкалы тяжести течения CDI, учитывающие риск развития осложнений [16]. Одной из самых прогностически точных шкал является ATLAS, включающая 5 критериев: возраст пациента (A — age), температуру тела (T — temperature), уровень лейкоцитов (L — leukocyte count), альбумина (A — albumin) и сывороточного креатинина (S — serum creatinine) (табл. 1) [16]. Каждый параметр характеризуется определенным числом баллов от 0 до 2, с увеличением их суммы риск неудовлетворительного результата терапии, развития осложнений или летального ис-

Таблица 1. Шкала ATLAS [16]

Table 1. ATLAS score [16]

Параметр Parameter	**0 баллов** 0 points	**1 балл** 1 point	**2 балла** 2 points
Возраст, лет Age, years	< 60	60–79	≥ 80
Температура, °C Fever, °C	≤ 37,5	37,6–38,5	≥ 38,6
Лейкоциты, × 10^9/л Leukocyte count, × 10^9/l	< 16	16–25	> 25
Альбумин, г/л Serum albumin, g/l	> 35	26–35	≤ 25
Креатинин, мкмоль/л Serum creatinine, μmol/l	≤ 120	121–179	≥ 180

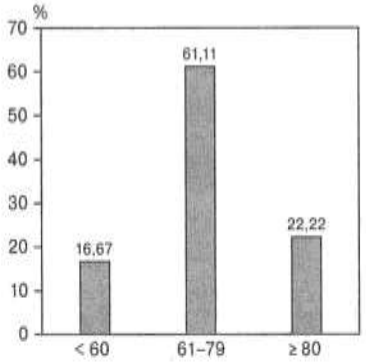

Рисунок 1. Распределение пациентов по возрасту (лет)

Figure 1. Patients age distribution (years)

хода увеличиваются [15]. Выбор тактики лечения крайне важен, так как опасность развития рецидивов увеличивается двукратно после второго и третьего эпизода [12].

Цель данного исследования — выявить эпидемиологические и клинические особенности течения энтероколита, вызванного *C. difficile*, у госпитализированных пациентов Инфекционной клиники г. Варны (Болгария) путем решения следующих задач:

1. определение факторов риска развития CDI у наших пациентов;
2. изучение особенностей течения CDI;
3. объективизация тяжести течения CDI с помощью оценочной шкалы ATLAS.

Материалы и методы

Ретроспективно были проанализированы истории болезни 36 пациентов с диагнозом «энтероколит, вызванный *Clostridium difficile*», госпитализированных в инфекционную клинику Университетской больницы Святой Марины (Варна) в период с января 2018 г. по июнь 2019 г. Пациенты были включены в исследование при условии наличия острой диареи согласно определению ВОЗ, то есть при наличии трех и более дефекаций в сутки неоформленным стулом с патологическими примесями или без [19], а также при наличии антигена/токсина *C. difficile*, обнаруженного в фекалиях иммунохроматографическим методом. Были исключены другие инфекционные и неинфекционные причины диарейного синдрома, а также прослежены клинические симптомы и лабораторные отклонения в ходе заболевания. В работу включены записи из медицинской базы данных госпитализированных в клинику пациентов за указанный период. Количественные показатели рассчитаны статистически с помощью программы Microsoft Excel 2010. Количественные показатели выражены в виде среднего значения (Me) и стандартного отклонения (SD), достоверность различий между показателями оценивалась с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

В 2018 г. в клинику с диагнозом «энтероколит, вызванный *Clostridium difficile*» были госпитализированы 19 пациентов в возрасте от 14 до 92 лет, из них 15 женщин и 4 мужчин. За 7 месяцев 2019 г. в клинике пролечились 17 пациентов с тем же диагнозом в возрасте от 21 до 89 лет, из них 15 женщин и 2 мужчин. В общей структуре больных, госпитализированных с кишечными инфекциями за тот же период, их количество составляет 3,3%. Шесть пациентов (16,67%) были в возрасте до 60 лет, 22 (61,11%) — в возрасте между 60 и 79 лет, а 8 пациентов — старше 80 лет (рис. 1). Средний возраст пациентов составлял 69,8±16,4 лет.

Тщательно собранный анамнез позволил оценить факторы риска развития CDI: коморбидность, предшествующие госпитализации, употребление антибиотиков перед развитием диареи. Сопутствующие заболевания отсутствовали только у 4 (11,11%) пациентов, а у 32 (88,89%) отмечалась полиморбидность хронических сердечно-сосудистых, эндокринных, неврологических, нефрологических, опорно-двигательных или онкологических заболеваний. Наиболее часто встречающимися нозологиями были сахарный диабет 2 типа — 19 пациентов (56,78%) и хроническая почечная недостаточность — 9 (25%) пациентов.

Наличие в анамнезе госпитализаций, предшествующих настоящей, было установлено у 19 (52,78%) пациентов. Восемь (22,22%) из них получили лечение в ортопедической клинике по поводу перелома шейки бедра, 5 (13,89%) — в нефрологической клинике по поводу пиелонефрита, гидронефроза или хронической почечной недостаточности, в клинике неврологии получили лечение 3 (8,33%) пациента по поводу ишемического инсульта или его последствий. Один (2,78%) пациент сообщил, что был госпитализирован в кардиологическое отделение для лечения хронической сердечной недостаточности, 1 (2,78%) пациент получал лечение в инфекционной клинике с диагнозом «инфекционный мононуклеоз, осложненный острым гепатитом», и 1 (2,78%) пациентка проходила курс лучевой терапии в связи с наличием множественной миеломы (рис. 2).

Было установлено, что 31 (86,11%) пациенту была проведена антибактериальная монотерапия перед развитием диарейного синдрома, доведшего до настоящей госпитализации, а 5 (13,89%) не сообщали о наличии в анамнезе таковой. Антибиотики класса цефалоспоринов

(цефуроксим или цефтриаксон) использовались чаще всего: 15 (41,67%) пациентов указывали на их прием; на втором месте по частоте использования были фторхинолоны (ципрофлоксацин, левофлоксацин): об их употреблении сообщили 10 (27,78%) пациентов. Амоксиклав принимали 4 (11,11%) пациента, а клиндамицином и азитромицином были пролечены по 1 (2,78%) пациенту (рис. 3).

Клинические проявления клостридийного энтероколита у наших пациентов включали лихорадку, тошноту, рвоту, боль в животе, диарею с примесью слизи или крови различной интенсивности или без примеси. Установлено, что у 23 пациентов (63,89%) была нормальная температура тела (≤ 37,1°C), лихорадка до 38,5°C наблюдалась у 8 (22,22%) пациентов, а температура выше 38,6°C была зарегистрирована у 5 (13,89%) пациентов. Тошнота и рвота, в отличие от болей в животе, которые были отмечены у всех 36 (100%) пациентов, встречались относительно нечасто: 11 (30,56%) пациентов сообщали об их наличии. Диарейный синдром у 13 (36,11%) пациентов характеризовался частотой дефекаций до 5 раз в сутки, у такого же числа пациентов было от 6 до 9 дефекаций за 24 часа, а на более 10 дефекаций в сутки жаловались 10 пациентов (27,78%). Патологические примеси в стуле встречались у 26 (72,22%) человек (табл. 2).

Проанализировав уровень воспалительной реакции как ответ на возникшую клостридийную инфекцию, мы определили следующие уровни лейкоцитов: до 16,00 × 10^9/л у 27 (75%) человек, у 5 пациентов уровень лейкоцитов был между 16,00 × 10^9/л и 25,00 × 10^9/л, более 25,00 × 10^9/л лейкоцитов было зарегистрировано у 4 (11,11%) человек. Значения С-реактивного белка (СРБ) были менее 100 мг/л у 21 (58,33%) пациента, между 100 и 200 мг/л — у 12 (33,33%), а более 200 мг/л — у 3 (8,33%) госпитализированных.

Рисунок 3. Антибактериальная терапия в анамнезе пациентов
Figure 3. Recent antibiotic exposure

Рисунок 2. Предшествующие госпитализации
Figure 2. Previous hospitalization

Для оценки степени тяжести клостридийного энтероколита была предложена шкала ATLAS, согласно которой пациенты были распределены на следующие группы: 0 баллов — 3 пациента (8,33%), 1 балл — 5 пациентов (13,89%), 2 балла — 6 пациентов (16,67%), 3 балла — 3 пациента (8,33%), 4 балла — 7 пациентов (19,44%), 5 баллов — 6 пациентов (16,67%),

Таблица 2. Клинические проявления CDI
Table 2. Clinical manifestations of CDI

Клинические проявления Clinical manifestations of CDI	**Пациенты** Patients **(n = 36)**
Температура/Fever	
≤ 37,1°C	23 (63,89%)
37,2–38,5°C	8 (22,22%)
≥ 38,6°C	5 (13,89%)
Тошнота и рвота/Nausea and vomiting	
Присутствуют/Yes	11 (30,56%)
Отсутствуют/No	25 (69,44%)
Абдоминальная боль/Abdominal pain	
Присутствуют/Yes	36 (100%)
Отсутствуют/No	0 (0%)
Диарейный синдром, частота дефекаций Diarrhea, stool	
≤ 5	13 (36,11%)
6–9	13 (36,11%)
≥ 10	10 (27,78%)
Патологические примеси в стуле Blood or mucus in the stool	
Присутствуют/Yes	26 (72,22%)
Отсутствуют/No	10 (27,78%)

Таблица 3. Длительность пребывания в стационаре согласно баллам по шкале ATLAS
Table 3. Hospital stay and ATLAS score

ATLAS, баллы ATLAS, points	Количество пациентов Patients	Длительность госпитализации, дни Hospital stay, days
0	3	4,33±1,15
1	5	7±1,22
2	6	6,67±1,63
3	3	6,67±0,58
4	7	10,14±2,48
5	6	8,67±2,16
6	3	11,67±0,58
7	1	17
8	1	13
9	0	0
10	1	21

6 баллов — 3 пациента (8,33%), 7 баллов — 1 пациент (2,78%), 8 баллов — 1 пациент (2,78%), 9 баллов — ни одного пациента (0%), 10 баллов — 1 пациент (2,78%). Критерием выписки пациентов служило купирование диарейного синдрома, что отражает продолжительность пребывания в клинике. Мы определили, что у пациентов с большей суммой баллов синдром диареи и длительность госпитализации были более продолжительными (табл. 3).

Все наши пациенты получили инфузионную терапию глюкозо-солевыми растворами, при необходимости были скорректированы отклонения кислотно-щелочного и электролитного балланса. В зависимости от тяжести энтероколита использовались следующие варианты антибактериальной терапии длительностью от 5 до 14 дней: метронидазол 3 × 500 мг перорально у 11 (30,56%) пациентов, ванкомицин 4 × 125 мг перорально у 12 (33,33%) пациентов или их комбинация в таких же дозах у 9 (25%) пациентов.

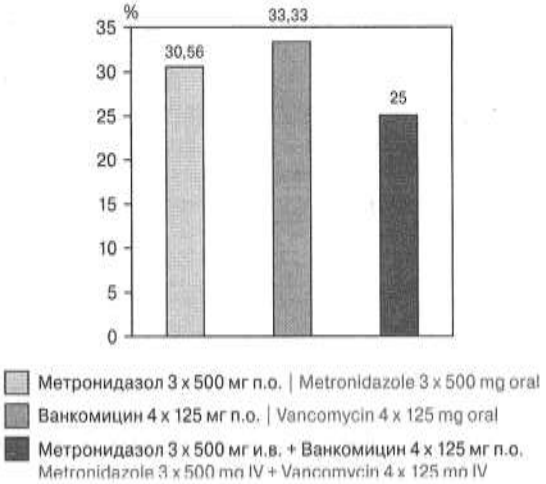

Рисунок 4. Антибактериальная терапия
Figure 4. Antibiotic treatment

При всех вариантах назначенный ранее на догоспитальном этапе не-антиклостридийный антибиотик был отменен (рис. 4)

Обсуждение

С января 2018 г. по июль 2019 г. в Инфекционной клинике г. Варны получили лечение 36 пациентов с диагнозом «вызванный *C. difficile* энтероколит», средний возраст которых составил 69,8±16,4 лет. Эти данные согласуются с современными представлениями, согласно которым клостридийный энтероколит чаще всего встречается у пациентов старше 65 лет [13]: у них не только выше риск развития этого заболевания в 13 раз, чем у пациентов в возрастной группе от 18 до 44 лет [14], но и рецидивы встречаются чаще [7]. В нашем исследовании была отражена и относительно новая тенденция — нарастание случаев данной нозологии у детей и молодых людей, двое из наших больных были в возрастной группе от 14 до 21 года [4]. В этих случаях основной путь заражения скорее внегоспитальный, чем нозокомиальный (что характерно для групп старшего возраста). Так и наши молодые пациенты не сообщают о госпитализации, которая предшествовала бы поступлению в инфекционную клинику. Госпитализация, особенно связанная с инвазивными процедурами и манипуляциями, — один из основных факторов риска развития CDI [1]: в нашем исследовании более половины пациентов (52,78%) были госпитализированы перед развитием диарейного эпизода, а 22,22% из них подверглись инвазивным процедурам.

Другим рисковым фактором высокой значимости была коморбидность: 88,89% наших пациентов страдают от различных сопутствующих заболеваний. В международных исследованиях наиболее рисковыми в отношении CDI являются сахарный диабет, почечная недостаточность, хронические колиты и онкологические заболевания [10]. В нашем исследовании те же нозологии были наиболее частыми сопутствующими заболеваниями: 56,78% страдали от сахарного диабета 2 типа, 25% — от хронической почечной недостаточности, а 2,78% имели злокачественные заболевания.

Использование антибиотиков — широко известный фактор риска развития CDI. Еще в 1998 г. первый проведенный по данной теме метаанализ доказал шестикратное увеличение риска развития этого типа инфекции после употребления системных антибиотиков. Клиндамицин, цефалоспорины и фторхинолоны наиболее часто приводят к развитию CDI [18]. Абсолютное большинство пациентов из нашего исследования (86,11%) принимали

антибиотики перед развитием диареи, а наиболее часто это были цефалоспорины, фторхинолоны, амоксиклав и клиндамицин, в соответствии с современными рекомендациями [7].

Клинические проявления CDI гетерогенны и многочисленны. У пациентов с симптоматикой они выражаются в общей интоксикации и колитных проявлениях, так как дистальный отдел толстого кишечника — основное место развития CDI. По этой причине симптомы поражения верхних отделов гастроинтестинального тракта встречались нечасто, только у одной трети пациентов. С другой стороны, лихорадка, диарея и боли в животе — наиболее часто встречающиеся симптомы. Степень их проявления в сочетании с лабораторными данными дают возможность объективной оценки тяжести течения инфекции, соответственно, оказывая влияние на терапевтический подход. С целью упрощения и объективизации показателей нами была использована шкала ATLAS, балльная система которой позволяет клиницистам быстро идентифицировать пациента с тяжелым клостридийным энтероколитом и высокой опасностью развития осложнений. Было установлено, что при меньшей сумме баллов быстрее купируется диарея и наступает выздоровление: у пациентов с 0 баллов госпитализация продлилась 4,33±1,15 дней, а пациентка с 15 баллами по шкале ATLAS пробыла на стационарном лечении 21 день.

В общей структуре заболеваемости пациентов Инфекционной клиники г. Варны с кишечными инфекциями число пациентов с энтероколитом, вызванным *C. difficile*, составило всего 3,3%, что, вероятнее всего, не отражает реальной заболеваемости, учитывая бесконтрольное использование антибиотиков и демографическое старение населения в Болгарии. Согласно данным Европейского сообщества по клинической микробиологии и инфекционным болезням, диагноз «клостридийный энтероколит» базируется на характерных клинических симптомах и наличии токсин-синтезирующего штамма *C. difficile* в фекальной пробе или наличии колоноскопически доказанного псевдомембранозного колита [6]. Наше исследование включало пациентов с обнаруженными иммунохроматографическим методом антигенами и токсинами A/B *C. difficile* в пробе кала. Субоптимальная чувствительность данного метода оставляет часть случаев CDI не диагностированными. Европейский центр по профилактике и контролю инфекционных заболеваний (ECDC) настоятельно рекомендует использовать двухфазовый протокол диагностики CDI, комбинирующий исследование фекальных проб на наличие глутаматдегидрогеназы, синтезированной *C. difficile*, или использование полимеразной цепной реакции, доказывающей наличие *C. difficile*. И только после получения положительного результата проба подвергается тестированию на наличие токсинов A/B. При этом преданалитический этап исследования особенно важен, так как вышеупомянутые токсины нестабильны и легко деградируют уже после двухчасового пребывания при комнатной температуре [3].

Этиологическое лечение антиклостридийным антибиотиком было проведено всем нашим пациентам. При легко протекающей инфекции применялась монотерапия метронидазолом (30,56%), в случае наличия инфекции среднего или тяжелого течения использовался ванкомицин в качестве монотерапии или комбинировано с метронидазолом. Вопреки накопившимся за последнее время сведениям о превосходстве ванкомицина над метронидазолом [11, 17], согласно Европейскому сообществу гастроэнтерологов, монотерапия метронидазолом при легком течении CDI все еще оправдана [6]. Патогенетическое лечение всех пациентов включало регидратационную терапию и коррекцию кислотно-щелочного и электролитного баланса.

Заключение

CDI — проблема с возрастающей актуальностью. Основной группой риска развития этой инфекции являются пожилые коморбидные пациенты с анамнестическими данными об использовании антибиотиков или госпитализациях.

Клинические проявления данной нозологии обычно включают лихорадку, диарею и боли в животе различной степени выраженности. При наличии этих симптомов у пациентов групп риска следует проводить диагностический поиск токсин-синтезирующих штаммов *C. difficile* и их свободных токсинов в фекальных пробах с помощью двуфазового протокола, что могло бы улучшить диагностику данной инфекции в целом.

Комбинация простых клинико-лабораторных данных, объединенных в оценочную шкалу ATLAS, позволяет определить степень тяжести клостридийного энтероколита у госпитализированных пациентов. Эффективная стратификация больных предоставляет докторам возможность выбрать максимально действенную тактику лечения и предотвратить развитие осложненных вариантов CDI. Кроме того, шкала ATLAS могла бы использоваться для разграничения подгрупп пациентов по степени тяжести CDI в исследовании новых терапевтических подходов к ее лечению, что несомненно необходимо при крайне ограниченном выборе для клиницистов в настоящем.

Список литературы/References

1. Campbell K.A., Phillips M.S., Stachel A., Bosco J.A III, Mehta S.A. Incidence and risk factors for hospital-acquired Clostridium diffcile infection among inpatients in an orthopaedic tertiary care hospital. *J. Hosp. Infect., 2013, vol. 83, no. 2, pp. 146–149. doi: 10.1016/j.jhin.2012.11.009*
2. Crobach M., Vernon J.J., Loo V.G., Kong L.Y., Pechine S., Wilcox M.H., Kuijper E.J. Understanding Clostridium difficile colonization. *Clin. Microbiol. Rev., 2018, vol. 31, no. 2: e00021-17. doi: 10.1128/CMR.00021-17*
3. Czepiel J., Dróżdż M., Pituch H., Kuijper E.J., Perucki W., Mielimonka A., Goldman S., Wultanska D., Garlicki A., Biesiada G. Clostridium difficile infection: review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 2019, vol. 38, no. 7, pp. 1211–1221. doi: 10.1007/s10096-019-03539-6*
4. Davidovics Z.H., Michail S., Nicholson M.R., Kociolek L.K., Pai N., Hansen R., Schwerd T., Maspons A., Shamir R., Szajewska H., Thapar N., de Meij T., Mosca A., Vandenplas Y., Kahn S.A., Kellermayer R.; FMT Special Interest Group of the North American Society of Pediatric Gastroenterology Hepatology, Nutrition, the European Society for Pediatric Gastroenterology Hepatology, Nutrition. Fecal microbiota transplantation for recurrent Clostridium difficile infection and other conditions in children: a joint position paper from the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., 2019, vol. 68, no. 1, pp. 130–143. doi: 10.1097/MPG.0000000000002205*
5. Davies K.A., Longshaw C., Davis G.L., Bouza E., Barbut F., Barna Z., Delmée M., Fitzpatrick F., Ivanova K., Kuijper E.J., Macovei I.S., Mentula S., Mastrantonio P., von Müller L., Oleastro M., Petinaki E., Pituch H., Norén T., Nováková E., Nyč O., Rupnik M., Schmid D., Wilcox M.H. Underdiagnosis of Clostridium difficile across Europe: the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of Clostridium difficile infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID). *Lancet Infect. Dis., 2014, vol. 14, no. 12, pp. 1208–1219. doi: 10.1016/S1473-3099(14)70991-0*
6. Debast S.B., Bauer M.P., Kuijper E.J.; European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for Clostridium difficile infection. *Clin. Microbiol. Infect., 2014, vol. 20, no. 2, pp. 1–26. doi: 10.1111/1469-0691.12418*
7. Deshpande A., Pasupuleti V., Thota P., Pant C., Rolston D.D., Hernandez A.V., Donskey C.J., Fraser T.G. Risk factors for recurrent Clostridium diffcile infection: a systematic review and meta-analysis. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol., 2015, vol. 36, no. 4, pp. 452–460. doi: 10.1017/ice.2014.88*
8. ECDC. Laboratory procedures for diagnosis and typing of human Clostridium difficile infection. *Stockholm: ECDC, 2018. 47 p. doi: 10.2900/04291*
9. Eze P., Balsells E., Kyaw M.H., Nair H. Risk factors for Clostridium difficile infections — an overview of the evidence base and challenges in data synthesis. *J. Glob. Health., 2017, vol. 7, no. 1: 010417. doi: 10.7189/jogh.07.010417*
10. Furuya-Kanamori L., Stone J.C., Clark J., McKenzie S.J., Yakob L., Paterson D.L., Riley T.V., Doi S.A., Clements A.C. Comorbidities, exposure to medications, and the risk of community-acquired Clostridium diffcile infection: a systematic review and meta-analysis. *Infect. Control Hosp. Epidemiol., 2015, vol. 36, no. 2, pp. 132–141. doi: 10.1017/ice.2014.39*
11. Johnson S., Louie T.J., Gerding D.N., Cornely O.A., Chasan-Taber S., Fitts D., Gelone S.P., Broom C., Davidson D.M.; Polymer Alternative for CDI Treatment (PACT) investigators. Vancomycin, metronidazole, or tolevamer for Clostridium difficile infection: results from two multinational, randomized, controlled trials. *Clin. Infect. Dis., 2014, vol. 59, no. 3, pp. 345–354. doi: 10.1093/cid/ciu313*
12. Kelly C.P. Can we identify patients at high risk of recurrent Clostridium difcile infection? *Clin. Microbiol. Infect., 2012, 18, no. 6, pp. 21–27. doi: 10.1111/1469-0691.12046*
13. Lessa F.C., Gould C.V., McDonald L.C. Current status of Clostridium diffcile infection epidemiology. *Clin. Infect. Dis., 2012, vol. 55, no. 2, pp. 65–70. doi: 10.1093/cid/cis319*
14. Lessa F.C., Mu Y., Bamberg W.M., Beldavs Z.G., Dumyati G.K., Dunn J.R., Farley M.M., Holzbauer S.M., Meek J.I., Phipps E.C., Wilson L.E., Winston L.G., Cohen J.A., Limbago B.M., Fridkin S.K., Gerding D.N., McDonald L.C. Burden of Clostridium difficile infection in the United States. *N. Engl. J. Med., 2015, vol. 372, no. 9, pp. 825–834. doi: 10.1056/NEJMoa1408913*
15. McDonald L.C., Gerding D.N., Johnson S., Bakken J.S., Carroll K.C., Coffin S.E., Dubberke E.R., Garey K.W., Gould C.V., Kelly C., Loo V., Shaklee Sammons J., Sandora T.J., Wilcox M.H. Clinical practice guidelines for Clostridium difficile infection in adults and children: 2017 update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). *Clin. Infect. Dis., 2018, vol. 66, no. 7: cix1085. doi: 10.1093/cid/cix1085*
16. Miller M.A., Louie T., Mullane K., Weiss K., Lentnek A., Golan Y., Kean Y., Sears P. Derivation and validation of a simple clinical bedside score (ATLAS) for Clostridium difficile infection which predicts response to therapy. *BMC Infect. Dis., 2013, vol. 13: 148. doi: 10.1186/1471-2334-13-148*
17. Nelson R.L., Suda K.J., Evans C.T. Antibiotic treatment for Clostridium difficile associated diarrhoea in adults. *The Cochrane Database Syst. Rev., 2017, vol. 3, no. 3: CD004610. doi: 10.1002/14651858.CD004610.pub5*
18. Slimings C., Riley T.V. Antibiotics and hospital-acquired Clostridium diffcile infection: update of systematic review and meta-analysis. *J. Antimicrob. Chemother., 2014, vol. 69, no. 4, pp. 881–891. doi: 10.1093/jac/dkt477*
19. WHO. Health topics. Diarrhoea. *URL: https://www.who.int/health-topics/diarrhoea#tab=tab_1*

Авторы:

Люцова Е.Д., ассистент кафедры инфекционных болезней, паразитологии и дерматовенерологии Медицинского университета им. профессора Параскева Стоянова, г. Варна, Болгария;

Господинова М.Д., профессор, д.м.н., руководитель кафедры инфекционных болезней, паразитологии и дерматовенерологии Медицинского университета им. профессора Параскева Стоянова, г. Варна, Болгария.

Authors:

Lyutsova E.D., Assistant Professor, Department of Infectious Diseases, Parasitology and Dermatovenereology, Medical University Prof. Dr. Paraskev Stoyanov, Varna, Bulgaria;

Gospodinova M.D., Professor, PhD, MD (Medicine), Department of Infectious Diseases, Parasitology and Dermatovenereology, Medical University Prof. Dr. Paraskev Stoyanov, Varna, Bulgaria.

Поступила в редакцию 17.01.2021
Отправлена на доработку 19.10.2021
Принята к печати 03.11.2021

Received 17.01.2021
Revision received 19.10.2021
Accepted 03.11.2021

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2022, vol. 12, no. 2, pp. 373–380

Инфекция и иммунитет
2022, Т. 12, № 2, с. 373–380

AN ASSOCIATION BETWEEN LOW VITAMIN D STATUS AND CHILDHOOD PNEUMONIA SEVERITY IN HOSPITALIZED BULGARIAN PATIENTS

N. Rimpova[a], V. Valcheva[b], A. Tsakova[c], H. Shivachev[d], D. Iliev[a]

[a] *Children's Hospital of the Medical University of Sofia, Sofia, Bulgaria*
[b] *Stephan Angeloff Institute of Microbiology of the Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria*
[c] *Aleksandrovska Hospital of the Medical University of Sofia, Sofia, Bulgaria*
[d] *N.I. Pirogov University Hospital for Emergency Medicine, Sofia, Bulgaria*

Abstract. Lower respiratory tract infections are among the most important causes of morbidity and mortality in the pediatric population worldwide. Despite advances in treatment and prevention, childhood pneumonia is the major reason for hospital admissions and remains a leading cause of death claiming an estimated 800 000 children's lives in 2018. Globally, over 1.23 million children died of pneumonia before reaching their 5th birthday — the equivalent of over 3400 deaths per day worldwide. There is growing evidence that vitamin D plays an important role in the immune system by modulating both innate and adaptive immunity. Vitamin D is an additional factor in the inflammatory response regulation. Its action is mediated via the vitamin D receptor (VDR), which is present in almost all types of immune cells, including activated $CD4^+$ and $CD8^+$ cells, B cells, macrophages, neutrophils and dendritic cells. Vitamin D deficiency is associated with decreased host defenses against infections. Therefore, our aim was to investigate whether low vitamin D status was a risk factor for pneumonia complications, usage of multiple antibiotics and prolonged hospital stay among hospitalized pediatric patients with community-aquired pneumonia. Total of 200 children (102 healthy controls and 98 with severe pneumonia) from 11 days to 17 years old were included in the study. Cases with severe pneumonia were subdivided into groups with and without complications (36 and 62, respectively). Electrochemiluminescence immunoassay was used to measure the serum 25-hydroxyvitamin D levels. The control group showed lower values than the study group. Cases with complicated pneumonia had significantly lower levels whitin the range of 29.7–68.0 nmol/l, compared with 49.1–88.6 nmol/l in cases without complications. A significant negative correlation was found between vitamin D concentrations and duration of hospital stay, the number of antibiotics used for treatment, and serum levels of inflammatory markers. The low status of vitamin D is related to the severity of the disease but has not been associated with the incidence/frequency of the disease. Children with low vitamin D levels may be at higher risk of developing life-threatening complications, intensive care admissions and a higher inflammatory response.

Key words: *severe pneumonia, serum 25-hydroxyvitamin D, children, vitamin D supplementation, inflammatory markers.*

Адрес для переписки:
Виолета Вылчева
1113, Болгария, София, ул. академика Георги Бончева, 26,
Институт микробиологии им. Стефана Ангелова Болгарской академии наук.
Тел.: +3592 979-31-57.
E-mail: violeta_valcheva@mail.bg

Contacts:
Violeta Valcheva
1113, Bulgaria, Sofia, Acad. Georgi Bonchev str., 26,
Stephan Angeloff Institute of Microbiology of the Bulgarian Academy of Sciences.
Phone: +3592 979-31-57.
E-mail: violeta_valcheva@mail.bg

Для цитирования:
Римпова Н., Вылчева В., Цакова А., Шивачев Х., Илиев Д. Связь дефицита витамина D с тяжестью пневмонии у госпитализированных детей в болгарии // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 2. С. 373–380. doi: 10.15789/2220-7619-AAB-1765

Citation:
Rimpova N., Valcheva V., Tsakova A., Shivachev H., Iliev D. An association between low vitamin D status and childhood pneumonia severity in hospitalized bulgarian patients // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 2, pp. 373–380. doi: 10.15789/2220-7619-AAB-1765

Работа выполнена при поддержке Медицинского университета Софии (грант № 335 от 15.01.2015).
This work was supported by Medical University of Sofia (grant No. 335/15.01.2015).

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-AAB-1765

СВЯЗЬ ДЕФИЦИТА ВИТАМИНА D С ТЯЖЕСТЬЮ ПНЕВМОНИИ У ГОСПИТАЛИЗИРОВАННЫХ ДЕТЕЙ В БОЛГАРИИ

Римпова Н.[1], Вылчева В.[2], Цакова А.[3], Шивачев Х.[4], Илиев Д.[1]

[1] *Детская больница Медицинского университета Софии, София, Болгария*
[2] *Институт микробиологии им. Стефана Ангелова Болгарской академии наук, София, Болгария*
[3] *Александровская больница Софийского медицинского университета, София, Болгария*
[4] *Университетская больница неотложной медицины им. Пирогова, София, Болгария*

Резюме. Инфекции нижних дыхательных путей являются одной из наиболее важных причин заболеваемости и детской смертности во всем мире. Несмотря на успехи в лечении и профилактике, детская пневмония является основной причиной госпитализации и смертности. В 2018 г. она унесла примерно 800 000 жизней. Во всем мире более 1,23 млн детей умерли от пневмонии, не дожив до своего пятилетия, что эквивалентно более 3400 смертям в день. Появляется все больше свидетельств того, что витамин D играет важную роль в иммунной системе, модулируя как врожденный, так и адаптивный иммунитет. Витамин D является дополнительным фактором регуляции воспалительной реакции. Его действие опосредуется рецептором витамина D (VDR), который присутствует практически во всех типах иммунных клеток, включая активированные клетки $CD4^+$ и $CD8^+$, В-клетки, макрофаги, нейтрофилы и дендритные клетки. Дефицит витамина D связан со снижением защиты хозяина от инфекций. Целью данного исследования был анализ низкого уровня витамина D как фактора риска осложнений пневмонии, использования нескольких антибиотиков и длительного пребывания в больнице среди госпитализированных педиатрических пациентов с внебольничной пневмонией. Всего в исследование были включены 200 детей (102 здоровых [контроль] и 98 с тяжелой пневмонией) в возрасте от 11 дней до 17 лет. Больные с тяжелой пневмонией были разделены на 2 группы: с осложнениями (36 человек) и без осложнений (62 человека). Для измерения уровней 25-гидроксивитамина D использовали электрохемилюминесцентный иммуноанализ. Контрольная группа показала более низкие значения, чем основная группа. Больные с осложненной пневмонией имели значительно более низкие уровни (в диапазоне 29,7–68,0 нмоль/л) по сравнению с больными без осложнений (в диапазоне 49,1–88,6 нмоль/л). Была обнаружена значимая отрицательная корреляция между концентрацией витамина D и продолжительностью пребывания в больнице, количеством антибиотиков, используемых для лечения, и уровнями маркеров воспаления в сыворотке крови. Низкий уровень витамина D связан с тяжестью заболевания, но не связан с заболеваемостью/частотой заболевания. Дети с низким уровнем витамина D могут подвергаться более высокому риску развития опасных для жизни осложнений, госпитализации с реанимацией и более выраженной воспалительной реакции.

Ключевые слова: *тяжелая пневмония, сыворотка 25-гидроксивитамина D, дети, добавки витамина D, маркеры воспаления.*

Introduction

Lower respiratory tract infections are among the most important causes of morbidity and mortality in the pediatric population worldwide. Despite advances in treatment and prevention, childhood pneumonia is a major reason for hospital admissions and remains a leading cause of death claiming an estimated 800 000 children's lives in 2018. Globally, over 1.23 million children died of pneumonia before reaching their 5th birthday — the equivalent of over 3400 deaths per day worldwide [27, 28].

There is growing evidence that vitamin D plays an important role in the immune system by modulating both innate and adaptive immunity. Vitamin D is an additional factor in the inflammatory response regulation [16]. Its action is mediated via the vitamin D receptor (VDR), which is present in almost all types of immune cells, including activated $CD4^+$ and $CD8^+$ cells, B cells, macrophages, neutrophils and dendritic cells. Vitamin D deficiency is associated with decreased host defenses against infections [6].

The relationship between vitamin D deficiency and the susceptibility to infections was investigated initially for tuberculosis patients [18]. Human alveolar macrophages stimulate the Toll-like receptors (TLR) in the presence of *M. tuberculosis*. TLR-activation upregulates VDR expression and vitamin D 1α-hydroxylase gene, thus increasing the local levels of $1,25(OH)_2D_3$ [22]. A positive correlation between vitamin D levels in respiratory epithelial cells and antimicrobial peptide mRNA production has been reported [14]. Cathelicidine and beta-defensins are important components of the innate immunity in the lower respiratory tract. They inhibit pneumococcal, meningococcal, and group A streptococcal disease-causing agents [2]. These local vitamin D effects suggest the role of its deficiency in the development of acute lower respiratory tract infections. Some studies report that low vitamin D status is a risk factor for more severe disease among hospitalized pneumonia patients [15]. Recent reviews also supported the possible role of vitamin D in decreasing the risk of COVID-19 infections and mortality [7]. Adequate vitamin D concentrations can be a beneficial factor in preventing serious illness, faster recovery, and reduced hospital stays [21].

The relationship between serum vitamin D levels and the incidence and severity of pneumonia in hospitalized children has not been analyzed yet

in Bulgaria. The aim of this study was to examine whether a low vitamin D status was a risk factor for complications of the disease, the use of multiple antibiotics and a long hospital stay in children with pneumonia. We hypothesized that lower levels of vitamin D contributed to a more severe clinical course of the disease.

Materials and methods

Patients characteristics. The study collection included 200 children aged 11 days to 17 years old from Pulmonology clinic with ICU at the University Children's Hospital, Sofia, from January 2015 to January 2019. A written informed consent was signed by each participant's parent upon enrollment. Ninety-eight children (48 male and 50 female) with severe pneumonia were chosen as study (pneumonia) group. Patients who developed complications, required admission to the ICU and/or surgical treatment were grouped into "complicated pneumonia". All other patients were subgrouped to the "non-complicated-pneumonia". One hundred and two healthy children (54 male and 48 female) selected in an outpatient setting were chosen as the control group. They were compared with the study group by sex and sampling season.

Immunoassay. Serum vitamin D levels were measured using Electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) for the *in vitro* determination of 25-hydroxy-vitamin D. Information for vitamin D intake prior to measurement was obtained for all the patients. All of them underwent venous puncture and withdrawal of 2–3 ml of blood. Serum was separated and immediately frozen at –20°C until measurement. For determination of the vitamin D status, the following cutoffs were set: > 75 nmol/l — sufficiency; 50–75 nmol/l — insufficiency; 25–50 nmol/l — deficiency and < 25 nmol/l — severe deficiency. These cutoff values were set in accordance with the data, published by the Institute of Medicine (IOM) [23].

Statistical analysis. The Spearman correlation coefficient was calculated as described previously using SPSS v.23.0 software [17] and was used to indicate the direction of association. Testing for normality of variables was performed, using Kolmogorov–Smirnov and Shapiro–Wilk tests. The Mann–Whitney U-test and the Kruskal–Wallis test were used to evaluate quantitative data. Range values are presented in brackets.

Results

Patients characteristics

Cases with severe pneumonia were subdivided into groups with and without complications (36 and 62, respectively). Only 6 children in the complicated pneumonia subgroup were found to be vitamin D supplemented. The proportion of supplemented children in the non-complicated pneumonia subgroup was much higher — 44. Complications were mainly pulmonary with parapneumonic effusion (Table 1).

Only 19,6% (n = 20) of the healthy children and 32.6% (n = 32) of pneumonia patients were found to be vitamin D supplemented. Median vitamin D intake in the healthy children group was 200 IU/day, whereas patients in both subgroups were receiving 500 IU — a significantly higher dose than controls by the time of study measurement (p = 0.013).

However, the study and control groups differed in age. The average age of the pneumonia group was 4 (2–8) years and the median age of the healthy controls was 7 (4–8) years, p = 0.002. Exclusion criteria for the children in the control group were history of respiratory symptoms one month prior to enrollment as well as any accompanying chronic disease.

We evaluated the relationship between the inflammatory markers (CRP, erythrocyte sedimentation rate, white blood count) and vitamin D levels in the pneumonia group. We also evaluated the length of hospital stay and duration of antibiotic treatment and looked for correlations with vitamin D status.

Overall vitamin D status

All children included in the study had a median vitamin D level of 52.4 (36.7–72.7) nmol/l, typically in the insufficient range. In the control group half of the children had deficiency. Only 16.7% of the children had sufficient vitamin D concentrations and 33.3% had insufficiency. Surprisingly, sufficient levels were more frequent for children with pneumonia, accounting 33.8%. In the pneumonia group 31.7% had insufficiency and 34.5% had deficiency.

In the pneumonia subgroups the larger proportion of the non-complicated pneumonia patients had sufficiency — 40.3%; deficiency was found in 27.4% and

Table 1. Types of complications in pneumonia subgroup

Complication		Number of cases	%
Pulmonary	Parapneumonic effusion	24	66.7
	Respiratory failure	6	16.7
	Pneumothorax	1	2.7
	Hydrothorax	1	2.7
	Atelectasis	1	2.7
	Necrotizing pneumonia	1	2.7
Extrapulmonary	Sepsis	1	2.7
	Hemolytic uremic syndrome (HUS)	1	2.7
Total		36	100

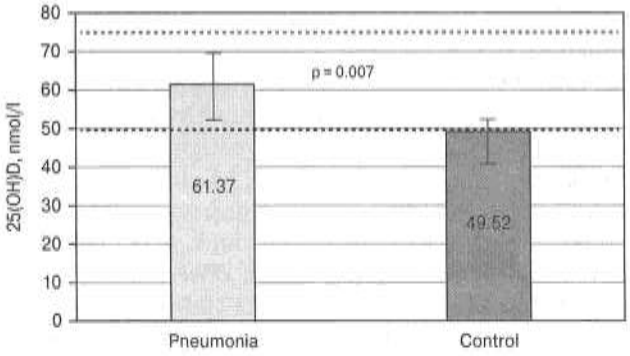

Figure 1. 25-hydroxyvitamin D level comparison between pneumonia and control group

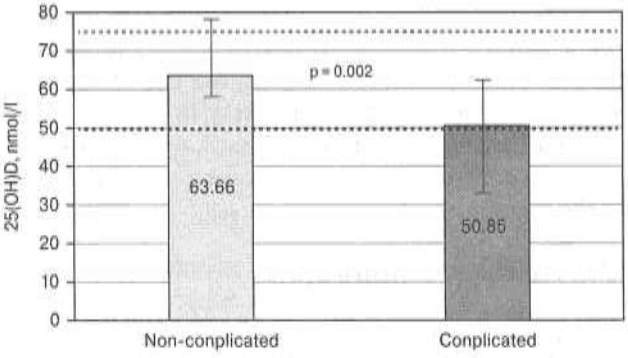

Figure 2. 25-hydroxyvitamin D levels comparison in pneumonia subgroups

insufficiency was present in 32.3%. In the complicated pneumonia group 47.2% had deficiency, 30.6% had insufficiency, and 22.2 had sufficiency.

No gender relationship between vitamin D levels in the pneumonia and control groups was found in this study.

Vitamin D levels

The pneumonia subgroup median 25-hydroxyvitamin D level was 61.3 (40.9–82.0) nmol/l, whereas in the control subgroup it was 49.5 (33.1–65.8) (Fig. 1). Using the Mann–Whitney U test we found significantly lower vitamin D levels in the control group (mean ranks: 111.75 and 98.6, U = 9147.5, Z = –2.269, p = 0.007, r = 0.19).

Pneumonia subgroups comparison

Vitamin D levels in the non-complicated and complicated pneumonia subgroups were 63.8 (49.1–88.6) nmol/l and 50.8 (29.7–68.0) nmol/l, respectively (Fig. 2). Patients who developed complications showed significantly lower levels than patients with no complications (mean ranks 57.02 and 36.54, U = 649.5, Z = –3.43, p = 0.001, r = 0.32).

Table 2. Comparison between vitamin D serum levels in children, receiving (yes) and not receiving (no) ICU procedures

Procedure		n	Median vitamin D, nmol/l	P
ICU admission	Yes	36	50.85	**0.001**
	No	62	63.85	
Oxygen supplementation	Yes	21	50.90	0.066
	No	77	62.15	
Mechanical ventilation	Yes	6	21.16	**0.0002**
	No	92	62.27	
Surgery	Yes	11	48.19	**0.029**
	No	87	62.43	

All complicated pneumonia patients were treated in an intensive care setting. Patients with surgical complications and mechanical ventilation were found to have significantly lower vitamin D concentrations in comparison to non-complicated pneumonia patients (Table 2).

Median vitamin D levels in all types of complications found in the study group are shown on Fig. 3.

OR for developing complicated pneumonia if 25-hydroxyvitamin D level was below 51 nmol/l was 1.925 times higher (CI 95% 1.15–3.20). Mortality rate due to pulmonary complications in the complicated pneumonia subgroup was 8.3%, accounting for 3 cases. Their vitamin D levels were within the deficiency and severe deficiency state — 9.0 nmol/l, 9.2 nmol/l and 35.3 nmol/l.

This study was not conducted to evaluate seasonal vitamin D variations. However, we compared vitamin D levels in different seasons for the main groups — pneumonia and control, but not for pneumonia subgroups. Statistically, there was no significant difference between vitamin D levels in pneumonia and cotrol groups across seasons (not shown). However, this might be due to the small sample sizes.

Inflammatory markers

Significant negative correlation between serum vitamin D values and levels of the inflammatory markers — CRP and erythrocyte sedimentation rate (ESR) was found. White blood count (WBC) did not correlate with vitamin D concentrations, though there was a tendency towards higher leucocyte number at lower 25-hydroxyvitamin D level (Table 3).

Hospital stay and duration of antibiotic treatment

In the study group, significant negative correlation between serum vitamin D levels and lenght of hospital stay, as well as duration of intravenous antibiotic treatment was established (Table 4).

Complicated pneumonia patients had significantly longer hospital stay and thus longer antibiotic therapy than non-complicated pneumonia cases.

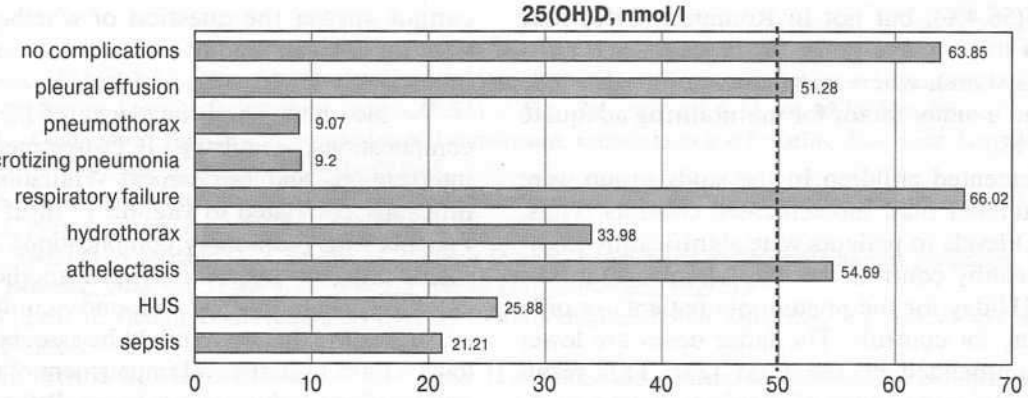

Figure 3. Vitamin D levels (median values) related to pneumonia complications

Patients in the complicated pneumonia subgroup had significantly longer hospital stay of 12 days (8–20), compared to non-complicated pneumonia patients, who were hospitalized for 5 days (5–7.5), p = 0.0001.

Median duration of antibiotic treatment in non-complicated pneumonia patients was 5 days (5–6), whereas complicated pneumonia patients were treated significantly longer — 10 days (7–15), p = 0.0001.

Number of antibiotics

In the pneumonia group 56% (n = 55) received 1 intravenous antibiotic for treatment, whereas 44% (n = 43) needed multiple antibiotic treatment.

In the non-complicated pneumonia subgroup 76% (n = 47) were treated with monotherapy, whereas 24% (n = 15) received multiple antibiotic therapy. In the complicated pneumonia subgroup 22% (n = 8) were treated with monotherapy and 78% (n = 28) received multiple antibiotic therapy.

Median vitamin D levels were significantly lower in children, receiving multiple intravenous antibiotic therapy at 51.6 nmol/l, compared to those requiring monotherapy at 64.0 nmol/l (p = 0.004).

Frequent respiratory illness was reported for 45% (n = 44) of the study group and for 21% (n = 21) of the control group.

Discussion

All 200 children who participated in this study had overall deficient and nsufficient vitamin D levels. This result confirms previously published data by Holick and Palacios on the high prevalence of inadequate vitamin D status among children and adolescents worldwide [9, 10, 19]. Since subjects of this study were chosen not to have underlying conditions known to affect vitamin D production, we assume limited sun exposure and reduced dietary intake and supplementation to be the main causes of this result. It has been recognized hat using sunscreen with SPF 30 might inhibit up to 95% of vitamin D skin production [8].

It has been found that pneumonia occurs throughout the year with a peak frequency in winter, when serum vitamin D concentrations are naturally depleted. In comparison with other studies, vitamin D levels in our healthy subjects are generally low [5, 20, 25]. This might be explained with the fact, that determination of vitamin D status was based mainly on winter serum concentrations. Much of our studied controls, higher than 50%, showed deficient levels. Different studies estimated large variation of vitamin D status within different European countries. In details, Lips et al. concluded that deficiency of vitamin D levels in healthy children in Europe were present in almost as high proportion in Germany (44.5%), Greece (40.5%)

Table 3. Correlation between vitamin D concentrations and inflammatory markers in all pneumonia patients

Value	CRP, mg/L	ESR, mm/h	WBC, n × 10^9/l
Median	32.1	32.0	11.2
Range	0.38–390.0	2–15	0.8–40.5
Spearman correlation coefficient	–0.357	–0.237	–0.045
p-value	0.001	0.047	0.674

Table 4. Vitamin D levels and duration of hospital stay and intravenous antibiotic therapy in all pneumonia patients

Correlation between vitamin D levels	Hospital stay (days)	AB-treatment i.v. (days)
Median	7.00	5.50
Range	5–30	0–21
Spearman correlation coefficient	–0.238	–0.254
p-value	0.018	0.013

and UK (56.4%), but not in Romania (29%) may be due to the low age range of the examined children (0–3 years), where supplementation was wide spread and a major factor for maintaining adequate levels [4, 13].

Supplemented children in the study group were a larger number than supplemented controls. Thus, vitamin D levels in patients were significantly higher than healthy controls. Median vitamin D intake was 500 IU/day for the pneumonia patients vs only 200 IU/day for controls. The latter doses are lower than recommended by the IOM [23]. This result highlights the importance of supplementation in elevating and maintaining adequate vitamin D status. In this study, however, supplementation proves not to be sufficient.

Since vitamin D serum levels were higher in patients, compared to controls, we assumed that vitamin D status was not a major factor for pneumonia incidence. Vitamin D status, however might be a factor for disease severity, since cases with pneumonia complications had significantly lower vitamin D levels, than non-complicated pneumonia patients. Complicated pneumonia patients had insufficient vitamin D levels along with significantly elevated inflammatory markers, causing usage of multiple antibiotics and prolonged length of hospital stay for adequate treatment and observation.

In terms of laboratory tests, the most important for assessing the severity of pneumonia are C-reactive protein (CRP) and the parallel leukocyte count, DCC and ESR. CRP is one of the generally accepted markers in clinical practice, reflecting the magnitude of the activity of inflammatory processes and tissue damage. According to Van den Berghe et al., the inflammatory markers, among which CRP, ESR and WBC levels were negatively correlated with vitamin D concentrations. In the conditions of active inflammation, vitamin depletion, as well as increase or decrease of the inflammatory response parallel processes are completely possible [26].

High dose supplementation in the course of treatment of pneumonia did not lower inflammatory markers, but reduced disease relapses. Although the degree of inflammatory response is known to vary individually due to factors unrelated to vitamin D status, we hypothesize that our results are consistent with the immunomodulatory role of vitamin D in infectious diseases. 25-hydroxyvitamin D increases the antimicrobial peptide synthesis in lungs. In addition, it induces the switch of Th1 to a more regulatory Th2 type of immune response [18]. Thus, adequate 25-hydroxyvitamin D concentration could be protective against the adverse physiologic effects that occur in excessive inflammatory areas. [3, 12, 22, 26]

Our observational study has indicated that there is an association between low serum vitamin D levels and elevated markers of inflammation at presentation of the disease acute pneumonia but we cannot answer the question of whether decreased vitamin D levels lead to or cause increased inflammatory activity.

We also found high incidence of life-threatening complications, requiring ICU-treatments, surgical interventions and mechanical ventilation to be significantly correlated to vitamin D insufficient levels. Patients with pulmonary complications – parapneumonic effusion, hydrothorax, pneumothorax and necrotizing pneumonia had profound vitamin D deficiency, suggesting that there might be association between low vitamin D status and impairment of the local immune defense in lung parenchyma. Patients developed respiratory failure did not show lower vitamin D levels. This might be due to other factors, such as anatomical features of pediatric patients, including low chest wall compliance – important factor in the development of respiratory failure. Correlation between vitamin D deficiency and severity in hospitalized pneumonia patients was found by Sakka, De Oliveira and Inamo, showing similar results [1, 11, 24]

The chances of developing complicated pneumonia when serum levels are below 51 nmol/l are quite small in this study. However, complications were major and associated with multiple use of antibiotics, longer therapy, and prolonged hospital stay.

Pneumonia is widely recognized as a leading cause of death among the pediatric population under the age of 5, especially in developing countries. Vitamin D may be important for an adequate immune response in developing lungs, especially in the setting of infection. Children with low levels of vitamin D were likely to have higher inflammatory markers and might be at higher risk of developing life-threatening complications. Whether vitamin D supplementation is helpful in preventing complications of pneumonia or in reducing inflammatory markers in children is a matter of further large scale studies.

We found high rates of insufficient and deficient vitamin D levels in all participants. Attention should be paid to supplementation of healthy children. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations were not related to pneumonia incidence. However, low vitamin D levels were associated with disease severity. Children with low levels of vitamin D might be at higher risk for developing life-threatening complications, higher inflammatory response at presentation, ICU-admission, usage of more than one antibiotics and prolonged hospital stay.

Acknowledgements

The authors thank the Health Insurance Fund Doverie and Medcross Outpatient Care Centers for providing the controls group. We are grateful to the medical personnel at the Children's Hospital of the Medical University of Sofia, Pediatric Surgery Clinic at the N.I. Pirogov University Hospital for Emergency Medicine.

References

1. De Oliveira C., Biddulph J.P., Hirani V., Schneider I.J.C. Vitamin D and inflammatory markers: cross-sectional analyses using data from the English Longitudinal Study of Ageing (ELSA). *J. Nutr. Sci., 2017, vol. 6: e1. doi: 10.1017/jns.2016.37*
2. De Smet K., Contreras R. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol. Lett., 2005, vol. 27, no. 18, pp. 1337–1347. doi: 10.1007/s10529-005-0936-5*
3. Dhungel A., Alam M. Efficacy of vitamin D in children with pneumonia: a randomized control trial study. *Janaki Med. Coll. J. Med. Sci., 2016, vol. 3, no. 1, pp. 5–13. doi: 10.3126/jmcjms.v3i1.15369*
4. Ene M.C., Tertiu O., Vrancianu O., Chifiriuc M. Vitamin D status in adult and pediatric Romanian population. *Rom. Arch. Microbiol. Immunol., 2018, vol. 77, no. 3, pp. 198–212. doi: 10.1371/journal.pone.0128010*
5. Esposito S., Lelii M. Vitamin D and respiratory tract infections in childhood. *BMC Infect Dis., 2015, vol. 15: 487. doi: 10.1186/s12879-015-1196-1*
6. Gois P.H.F., Ferreira D., Olenski S., Seguro A.C. Vitamin D and infectious diseases: simple bystander or contributing factor? *Nutrients, 2017, vol. 9, no. 7: 651. doi: 10.3390/nu9070651*
7. Grant W.B., Lahore H., McDonnell S.L., Baggerly C.A., French C.B., Aliano J.L., Bhattoa H.P. Evidence that Vitamin D supplementation could reduce risk of influenza and COVID-19 infections and deaths. *Nutrients, 2020, vol. 12, no. 4: 988. doi: 10.3390/nu12040988*
8. Holick M.F. Vitamin D deficiency. *N. Engl. J. Med., 2007, vol. 357, no. 3, pp, 266–281. doi: 10.1056/NEJMra070553*
9. Holick M.F. Vitamin D: extraskeletal health. *Rheum Dis. Clin. North. Am., 2012, vol. 38, no. 1, pp. 141–160. doi: 10.1016/j.rdc.2012.03.013*
10. Hossein-Nezhad A., Holick M.F. Optimize dietary intake of vitamin D: an epigenetic perspective. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care, 2012, vol. 15, no. 6, pp. 567–579. doi: 10.1097/MCO.0b013e3283594978*
11. Inamo Y., Hasegawa M., Saito K., Hayashi R., Ishikawa T., Yoshino Y., Hashimoto K., Fuchigami T. Serum vitamin D concentrations and associated severity of acute lower respiratory tract infections in Japanese hospitalized children. *Pediatr. Int., 2011, vol. 53, no. 2, pp. 199–201. doi: 10.1111/j.1442-200x.2010.03224.x*
12. Landry A., Docherty P., Ouellette S., Cartier L.J. Causes and outcomes of markedly elevated C-reactive protein levels. *Can. Fam. Physician., 2017, vol. 63, no. 6, pp. e316–e323.*
13. Lips P., Cashman K.D., Lamberg-Allardt C., Bischoff-Ferrari H.A., Obermayer-Pietsch B., Bianchi M.L., Stepan J., El-Hajj Fuleihan G., Bouillon R. Current vitamin D status in European and Middle East countries and strategies to prevent vitamin D deficiency: a position statement of the European Calcified Tissue Society. *Eur. J. Endocrinol., 2019, vol. 180, no. 4, pp. 23–54. doi: 10.1530/EJE-18-0736*
14. Liu P.T., Stenger S., Li H., Wenzel L., Tan B.H., Krutzik S.R., Ochoa M.T., Schauber J., Wu K., Meinken C., Kamen D.L., Wagner M., Bals R., Steinmeyer A., Zügel U., Gallo R.L., Eisenberg D., Hewison M., Hollis B.W., Adams J.S., Bloom B.R., Modlin R.L. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science, 2006, vol. 311, no. 5768, pp. 1770–1773. doi: 10.1126/science.1123933*
15. Mamani M., Muceli N., Ghasemi Basir H.R., Vasheghani M., Poorolajal J. Association between serum concentration of 25-hydroxyvitamin D and community-acquired pneumonia: a case-control study. *Int. J. Gen. Med., 2017, vol. 10, pp. 423–429. doi: 10.2147/IJGM.S149049*
16. Martens P.-J., Gysemans C., Verstuyf A., Mathieu C. Vitamin D's effect on immune function. *Nutrients, 2020, vol. 12, no. 5: 1248. doi: 10.3390/nu12051248*
17. Mukaka M.M. Statistics corner: a guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Med. J., 2012, vol. 24, no. 3, pp. 69–71.*
18. Nnoaham K.E., Clarke A. Low serum vitamin D levels and tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Epidemiol., 2008, vol. 37, no. 1, pp. 13–19. doi: 10.1093/ije/dym247*
19. Palacios C., Gonzalez L. Is vitamin D deficiency a major global public health problem? *J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 2014, vol. 144, pt. A, pp. 38–45. doi: 10.1016/j.jsbmb.2013.11.003*
20. Pilz S., Rutters F., Dekker J.M. Disease prevention: vitamin D trials. *Science, 2012, vol. 338, no. 6109: 883. doi: 10.1126/science.338.6109.883-c*
21. Pletz M.W., Terkamp C., Schumacher U., Rohde G., Schütte H., Welte T., Bals R.; CAPNETZ-Study Group. Vitamin D deficiency in community-acquired pneumonia: low levels of 1,25(OH)2 D are associated with disease severity. *Respir. Res., 2014, vol. 15, no. 1: 53. doi: 10.1186/1465-9921-15-53*
22. Rolf L., Muris A.H., Hupperts R., Damoiseaux J. Vitamin D effects on B cell function in autoimmunity. *Ann. N.Y. Acad. Sci., 2014, vol. 1317, pp. 84–91. doi: 10.1111/nyas.12440*
23. Ross A.C., Manson J.E., Abrams S.A., Aloia J.F., Brannon P.M., Clinton S.K., Durazo-Arvizu R.A., Gallagher J.C., Gallo R.L., Jones G., Kovacs C.S., Mayne S.T., Rosen C.J., Shapses S.A. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *J. Clin. Endocrinol. Metab., 2011, vol. 96, no. 1, pp. 53–58. doi: 10.1210/jc.2010-2704*
24. Sakka A.S.E., Iman S.S., Amer H.A., Moustafa S.A. Vitamin D deficiency and low hemoglobin level as risk factors for severity of acute lower respiratory tract infections in Egyptian children: a case-control study. *Egypt. Pediatr. Assoc Gaz., 2014, vol. 62, pp. 1–7. doi: 10.1016/j.epag.2013.12.001*
25. Şişmanlar T., Aslan A.T., Gülbahar Ö., Özkan S. The effect of vitamin D on lower respiratory tract infections in children. *Turk. Arch. Pediatr., 2016, vol. 51, no. 2, pp. 94–99. doi: 10.5152/TurkPediatriArs.2016.3383*
26. Van den Berghe G., Van Roosbroeck D., Vanhove P., Wouters P.J., De Pourcq L., Bouillon R. Bone turnover in prolonged critical illness: effect of vitamin D. *J. Clin. Endocrinol. Metab., 2003, vol. 88, no. 10, pp. 4623–4632. doi: 10.1210/jc.2003-030358*

27. WHO. WHO-UNICEF Estimates of National Immunization Coverage (WUENIC), 1980–2019 (July, 2020). *URL: https://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary/timeseries/tswucoveragedtp3.html*
28. WHO. Pneumonia and diarrhea progress report. *URL: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/pneumonia (02.08.2019)*

Авторы:
Римпова Н., ассистент кафедры педиатрии, Детская больница Медицинского университета Софии, София, Болгария;
Вылчева В., к.н., доцент кафедры инфекционной микробиологии, Институт микробиологии им. Стефана Ангелова Болгарской академии наук, София, Болгария;
Цакова А., ведущий ассистент центральной клинической лаборатории, Александровская больница Софийского медицинского университета, София, Болгария;
Шивачев Х., к.н., доцент, клиника детской хирургии Университетской больницы неотложной медицины им. Пирогова, София, Болгария;
Илиев Д., к.н., доцент кафедры педиатрии, Детская больница Медицинского университета Софии, София, Болгария.

Authors:
Rimpova N., MD, Assistant Professor, Department of Paediatrics, Children's Hospital of the Medical University of Sofia, Sofia, Bulgaria;
Valcheva V., PhD, Associate Professor, Department of Infectious Microbiology, Stephan Angeloff Institute of Microbiology of the Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria;
Tsakova A., Head Assistant Professor, Central Clinical Laboratory, Aleksandrovska Hospital of the Medical University of Sofia, Sofia, Bulgaria;
Shivachev H., PhD, Associate Professor, Clinic of Pediatric Surgery, N.I. Pirogov University Hospital for Emergency Medicine, Sofia, Bulgaria;
Iliev D., PhD, Associate Professor, Department of Paediatrics, Children's Hospital of the Medical University of Sofia, Sofia, Bulgaria.

Поступила в редакцию 10.07.2021
Отправлена на доработку 20.08.2021
Принята к печати 22.09.2021

Received 10.07.2021
Revision received 20.08.2021
Accepted 22.09.2021

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2022, vol. 12, no. 2, pp. 381–385

Инфекция и иммунитет
2022, Т. 12, № 2, с. 381–385

ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИТОВ *CANDIDA* spp. НА ФИБРОБЛАСТЫ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА

Н.И. Игнатова[1], М.И. Заславская[1], Н.А. Александрова[1], О.Е. Орлова[2], В.Г. Мельников[3]

[1] *ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава РФ, Нижний Новгород, Россия*
[2] *ГБУЗ Городская клиническая больница № 67 им. Л.А. Ворохобова, Москва, Россия*
[3] *ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия*

Резюме. Возрастающее участие микромицетов в этиологии инфекционных заболеваний заставляет рассматривать их наравне с бактериальными и вирусными возбудителями. Большой вклад в течение тяжелых форм кандидозов вносят *C. auris*, *C. albicans*, не менее важен вклад *C. glabrata* и *C. krusei*. Постоянное присутствие кандид на эпителии и слизистой формирует систему устойчивого взаимодействия микроорганизмов и клеток человека, где кандиды оказывают как прямое, так и опосредованное влияние. Способность продуцировать метаболиты, содержащие факторы патогенности, является одним из важных факторов перехода к инвазивному кандидозу, при котором эпителиальные клетки человека функционируют как первый барьер, препятствующий инвазии *Candida* spp. во внутренние ткани хозяина. Цель настоящего исследования — характеристика результатов воздействия метаболитов эпидемиологически значимых видов кандид на нормальные фибробласты кожи человека. Исследование проводили на культуре фибробластов кожи человека *in vitro*. Оценивали влияние метаболитов кандид на структуру монослоя и жизнеспособность фибробластов в суспензионной культуре клеток. Эксперименты показали, что метаболиты кандид могут непосредственно вызывать гибель фибробластов кожи человека, при этом биоцидная активность является штамм-зависимым признаком. Прямая биоцидность в отношении дермальных клеток была наиболее характерна для штаммов *C. glabrata* и *C. krusei*, менее выражена у *C. albicans* и очень слабо — у штаммов *C. auris*. Исследовался также механизм биоцидного действия секреторных продуктов разных видов кандид на дермальные фибробласты *in vitro*. Было установлено, что уже через час от начала эксперимента после обработки слоя дермальных клеток фунгальными метаболитами наблюдалась гибель фибробластов, которая усиливалась к трем часам. Гибель клеток происходила в равной степени как путем апоптоза, так и некроза. Необходимо отметить, что биоцидный потенциал продуктов метаболизма не коррелировал со способностью кандид расщеплять межклеточные связи в культуре фибробластов. Установлено, что метаболиты *C. auris*, показавшие слабую биоцидность в отношении отдельных клеток фибробластов, одновременно вызывали более выраженное, чем у других видов кандид, разрушение структуры клеточного монослоя. Возможно, именно это качество *C. auris*, позволяющее данному виду эффективнее прочих кандид разрушать плотную структуру тканей в организме человека, может служить объяснением их высокой инвазивности.

Ключевые слова: *Candida spp., метаболиты, ферментативная активность, дермальные фибробласты, биоцидность, цитопатическое действие.*

Адрес для переписки:
Игнатова Надежда Ивановна
603005, Россия, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 70,
ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава РФ.
Тел.: 8 (831) 422-13-33 (служебн.), 8 930 817-25-30 (моб.).
E-mail: n.i.evteeva@gmail.com

Contacts:
Nadezhda I. Ignatova
603005, Russian Federation, Nizhny Novgorod, Gagarina pr., 70,
Privolzhsky Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation.
Phone: +7 (831) 422-13-33 (office), +7 930 817-25-30 (mobile).
E-mail: n.i.evteeva@gmail.com

Для цитирования:
Игнатова Н.И., Заславская М.И., Александрова Н.А., Орлова О.Е., Мельников В.Г. Влияние метаболитов Candida spp. на фибробласты кожи человека // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 2. С. 381–385. doi: 10.15789/2220-7619-IOC-1795

Citation:
Ignatova N.I., Zaslavskaya M.I., Alexandrova N.A., Orlova O.E., Melnikov V.G. Impact of Candida spp. metabolites on human skin fibroblasts // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 2, pp. 381–385. doi: 10.15789/2220-7619-IOC-1795

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-IOC-1795

IMPACT OF *CANDIDA* spp. METABOLITES ON HUMAN SKIN FIBROBLASTS

Ignatova N.I.[a], Zaslavskaya M.I.[a], Alexandrova N.A.[a], Orlova O.E.[b], Melnikov V.G.[c]

[a] *Privolzhsky Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation*
[b] *City Clinical Hospital No. 67 named after L.A. Vorokhobov, Moscow, Russian Federation*
[c] *Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after G.N. Gabrichevsky of Rospotrebnadzor, Moscow, Russian Federation*

Abstract. Micromycetes spp. have been increasingly involved in the etiology of infectious diseases guiding to consider them not as important as bacterial and viral pathogens. Nowadays, a lot of severe forms of candidiasis are caused by *C. auris*, *C. albicans*, whereas *C. glabrata* and *C. krusei* are of similar importance. Members of these species were selected to investigate related metabolite action on human skin fibroblasts. *Candida* spp. being continuously found on the epithelium and mucosal membranes resulting in to sustained interaction between microbiota and human cells. Potential to produce metabolites containing pathogenicity factors is one of the crucial events for transition to invasive candidiasis, wherein human epithelial cells build up the front line of defense barrier preventing *Candida* spp. invasion into deeper host tissues. The study was aimed at assessing data on metabolite effects derived from epidemiologically relevant *Candida* spp. on primary human skin fibroblast culture *in vitro*. In particular, there were analyzed *Candida* spp. metabolites acting on fibroblast monolayer integrity and viability in cell suspension. It was found that *Candida* spp. metabolites might directly cause fibroblast death so that biocidal activity was exhibited as a strain-specific feature. A direct biocidity against dermal cells was more typical for strains *C. glabrata* и *C. krusei*, less pronounced for *C. albicans* and very weak for *C. auris*. In addition, a mechanism for secretory product-related biocidal activity derived from various *Candida* spp. on dermal fibroblasts *in vitro* revealed that it resulted in fibroblasts death 1 hour after exposure that peaked at 3 hrs. Cell death was equally proceeded via apoptosis and necrosis. Of note, biocidal effect of fungal metabolites showed no correlation with *Candida*-related potential to cleave intercellular junctions. It was found that *C. auris* metabolites showing weak biocidity against some fibroblasts simultaneously resulted in more marked disruption of cell monolayer compared to other *Candida* spp. Perhaps, it is just a feature of *C. auris* that might account for its higher invasiveness potential allowing to destroy tight human tissues more effectively compared to other *Candida* spp.

Key words: *Candida spp., metabolites, enzymatic activity, dermal fibroblasts, biocidity, cytopathic effect.*

Введение

Микромицеты рода *Candida* являются основной причиной внутрибольничных микозов, в том числе инфекций кровотока. Значительный вклад в развитие тяжелых форм оппортунистических кандидозов вносят преимущественно *C. albicans* и *C. glabrata* [4, 5, 15]. *C. krusei* не так часто выделяют из клинического материала, как другие виды кандид, но они также способны вызывать тяжелые инфекции у иммунокомпрометированных лиц [4, 6]. Кроме того, в последние годы наблюдается рост системных микозов, связанных с относительно новым патогеном — *C. auris* [3, 7, 11, 12]. Инфекция, вызванная *C. auris*, может представлять глобальную угрозу здоровью населения из-за высокого уровня смертности, достигающей, по некоторым данным, 60% [9].

Эпителиальные клетки человека функционируют как первый барьер, препятствующий инвазии *Candida* spp. во внутренние ткани хозяина. Для преодоления этого барьера кандиды могут использовать различные механизмы: адгезины, секрецию ферментов, морфологическую трансформацию и др. Известно, что *C. albicans* синтезируют широкий спектр экзоферментов, в частности аспартилпротеазы и фосфолипазы, которые могут способствовать повреждению слизистых оболочек, кожи человека и инвазии в ткани [2,14,15]. Ферменты патогенности других видов кандид менее изучены. Полагают, что *C. glabrata* в основном используют аспарагиновые протеазы [5], *C. krusei* — фосфолипазы [6].

Высокая способность кандид колонизировать эпителиальные ткани часто формирует систему устойчивого взаимодействия микроорганизма и здорового человека — кандидоносительство. В то же время способность продуцировать метаболиты, содержащие факторы патогенности, является одним из важных факторов перехода от носительства к инвазивному кандидозу у пациентов со сниженным иммунитетом [15]. Таким образом, оценивая агрессивность фунгальных метаболитов в отношении клеток кожи или слизистых, можно оценить инвазивный потенциал различных видов кандид.

Цель настоящего исследования — характеристика результатов воздействия метаболитов эпидемиологически значимых видов кандид на нормальные фибробласты кожи человека.

Материалы и методы

В работе использовали клинические изоляты *C. albicans* (штаммы 195, 258, 290, 601), *C. auris* (штаммы 70, 78, 84, 95), *C. krusei* (штаммы 489, 583, 780) и *C. glabrata* (44-1, 294, 584). Продукты секреции кандид (метаболиты) получали после культивирования (37°C, 24 ч) микромицетов в жидкой среде Сабуро (HiMedia, Индия) путем сепарации от клеток при помощи фильтра (Corning, Германия) с диаметром пор 0,2 мкм. В каждом эксперименте использовали метаболиты только одного штамма кандид.

В качестве объекта воздействия метаболитов использовали нормальные (без патологии) фи-

бробласты кожи человека как в виде суспензии изолированных клеток, так и в виде монослоя. Монослой фибробластов получали путем культивирования (48 ч, 37°C, 5% CO_2) клеток в среде DMEM (Панэко, Москва) с добавлением 5% фетальной бычьей сыворотки в пластиковых 12- и 96-луночных планшетах Corning (Германия).

Оценка прямого биоцидного действия метаболитов кандид. Готовили суспензию изолированных фибробластов (3×10^6/мл), предварительно обработанных 0,25% раствором трипсина. К 50 мкл взвеси клеток добавляли 300 мкл метаболитов, в контроле — среду Сабуро. Фибробласты термостатировали (37°C, 1–3 часа), затем отбирали 20 мкл суспензии клеток и окрашивали 0,4% водным раствором трипанового синего. Подсчет жизнеспособных (неокрашенных) клеток проводили на счетчике TC20 Automated Cell Counter (Bio-Rad, США).

Оценка цитопатического действия метаболитов кандид. К монослою фибробластов, выращенных в 12-луночном планшете, добавляли 1 мл метаболитов кандид (в контроле — стерильную среду Сабуро), затем термостатировали (37°C, 24 ч). После инкубации монослой клеток микроскопировали с помощью Leica DM IL (Германия).

Оценка апоптоза и некроза фибробластов. Для определения механизма гибели фибробластов использовали окрашивание клеток по технологии Apoptosis/Necrosis Detection Kit (ab176950, США). Согласно протоколу, в случае некроза мембранный краситель DNA Nuclear Green окрашивает ядерные мембраны поврежденных фибробластов в зеленый цвет; при апоптозе накопление фосфатидилсерина в клетках отмечается флуоресцентым красителем красного цвета. К монослою фибробластов, выращенных в 96-луночном планшете, добавляли метаболиты кандид (200 мкл в одну лунку), инкубировали при 37°C. Контролем служила культура фибробластов в стерильной среде Сабуро. Через 1 и 3 часа от начала инкубации выявляли в монослое наличие клеток, имеющих признаки апоптоза или некроза/позднего апоптоза при помощи флуоресцентного микроскопа (Leica DM IL, Германия).

Все эксперименты ставили в трех повторах. Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни в программе Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

Через час после добавления метаболитов кандид к суспензии фибробластов в ряде случаев отмечалась гибель клеток, которая усиливалась к трем часам от начала эксперимента (табл.). При этом наблюдалась следующая тенденция: чаще всего агрессивность фунгальных метаболитов в отношении фибробластов была отмечена у штаммов *C. glabrata* и *C. krusei*, наименьший биоцидный эффект наблюдали у штаммов *C. auris*. Так, продукты секреции *C. glabrata* и *C. krusei* обладали существенным ($p < 0,05$) биоцидным действием в отношении фибробластов. Наиболее выражена биоцидность у штамма *C. glabrata* 44-1: его метаболиты в течение 3 часов увеличивали количество погибших фибробластов в 14,24±9,1 раза ($p < 0,05$). Метаболиты *C. glabrata* 294, *C. glabrata* 584, *C. krusei* 780 и *C. albicans* 601 через три часа инкубации вызывали гибель почти половины (42–49%) фибробластов в суспензии, а метаболиты *C. auris* 70 были способны индуцировать гибель около 13% фибробластов по окончании 3-часового эксперимента (табл.).

Для последующих экспериментов с монослоем дермальных фибробластов были отобраны штаммы *C. glabrata* 44-1, *C. albicans* 601, *C. krusei* 780 и *C. auris* 70 как обладающие максимальным биоцидным потенциалом среди представителей вида. Монослой фибробластов инкубировали (37°C) с продуктами метаболизма каждого штамма кандид в течение 1, 3 или 24 часов.

Эксперименты показали, что кратковременное (до 3 часов) воздействие метаболитов всех исследуемых штаммов на культуру фибробластов не меняло ее морфологию. В то же время 24-часовое воздействие метаболитов *C. auris* 70 приводило к изменению структуры монослоя (рис., А, III обложка). Данный цитопатический эффект проявлялся в том, что фибробласты в значительной мере утрачивали межклеточные связи и отслаивались одиночно или небольшими группами от поверхности планшета; форма клеток существенно менялась.

Суточное воздействие метаболитов *C. albicans* 601 также способствовало нарушению структуры монослоя, но в меньшей степени: слой фибробластов разрыхлялся, клетки округлялись, однако сцепление с поверхностью планшета сохранялось (рис., А). В то же время инкубация культуры фибробластов с метаболитами *C. krusei* 780 или *C. glabrata* 44-1 не приводила к существенным изменениям в структуре монослоя клеток (рис., А). Стоит отметить, что проведение дополнительных экспериментов с другими штаммами *C. auris* подтвердило ведущие позиции данного вида в способности разрушать межклеточные связи фибробластов в культуре (цитопатический эффект) по сравнению с различными штаммами *C. albicans*, *C. krusei* и *C. glabrata*.

Для исследования динамики и механизмов гибели клеток в монослое после воздействия фунгальных метаболитов использовали окрашивание культуры с помощью технологии Apoptosis/Necrosis Detection Kit (рис., Б, В, III обложка). Было обнаружено, что через 3 часа после обработки слоя дермальных клеток фунгальными метаболитами наблюдалась гибель фибробластов, которая происходила в равной мере как путем апоптоза, так и некроза. При этом продукты секреции разных представителей кандид отличались по способности индуцировать гибель

Таблица. Влияние метаболитов *Candida* spp. на жизнеспособность дермальных фибробластов человека
Table. *Candida* spp. metabolites influence on dermal human fibroblasts viability

Штаммы кандид *Candida* strains	**Процент жизнеспособных фибробластов после 1- и 3-часовой инкубации с метаболитами кандид** Percentage of viable fibroblasts 1- and 3-hour after incubation with *Candida* metabolites		**Кратность снижения жизнеспособности фибробластов относительно контроля** Fold decrease in fibroblast viability compared to control	
	1 ч/1 h	**3 ч**/3 h	**1 ч**/1 h	**3 ч**/3 h
Контроль/Control	98,67±0,58	96,67±0,57	–	–
***C. albicans* 195**	96,67±1,53	96,00±2,00	1,02±0,02	1,01±0,02
***C. albicans* 258**	95,33±1,66	93,26±1,71	1,04±0,03	1,06±0,02
***C. albicans* 290**	92,00±1,00	92,00±1,20	1,07±0,01	1,05±0,01
***C. albicans* 601**	87,25±2,36*	41,50±5,25*	1,12±0,01*	2,27±0,26*
***C. auris* 70**	92,75±0,58*	80,00±1,53*	1,05±0,01	1,19±0,02*
***C. auris* 78**	97,82±0,79	96,22±2,03	1,02±0,02	1,04±0,02
***C. auris* 84**	98,00±1,00	97,67±0,58	1,01±0,01	0,98±0,01
***C. auris* 95**	97,33±0,57	96,33±2,08	1,01±0,01	1,01±0,03
***C. glabrata* 44-1**	65,67±1,53*	7,50±5,57*	1,50±0,03*	14,24±9,10*
***C. glabrata* 294**	89,00±6,56*	40,25±11,24*	1,11±0,08*	2,31±0,56*
***C. glabrata* 584**	91,14±4,22*	56,71±7,35*	1,07±0,04	1,78±0,23*
***C. krusei* 489**	93,35±2,33*	87,29±3,13*	1,04±0,03	1,12±0,04*
***C. krusei* 583**	94,00±2,01*	84,67±3,21*	1,05±0,03	1,14±0,05*
***C. krusei* 780**	90,67±4,04*	50,33±6,80*	1,09±0,04	1,94±0,25*

Примечание. * — статистически значимые различия с контролем ($p < 0,05$).
Note. * — significant differences with control group ($p < 0,05$).

клеток в монослое: наибольший биоцидный эффект в культуре фибробластов проявляли метаболиты штаммов *C. krusei*, *C. glabrata* и *C. albicans*, в меньшей степени — *C. auris* (рис., Б, В).

Наши эксперименты выявили высокую биологическую активность продуктов секреции исследуемых видов кандид. Метаболиты ряда штаммов *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. albicans* и *C. auris* были способны вызывать гибель фибробластов (биоцидный эффект). Кроме того, метаболиты *C. auris* и в меньшей степени — *C. albicans* могли разрушать межклеточные связи в монослое дермальных клеток. Исследование вариантов гибели фибробластов показало, что продукты метаболизма кандид не только способны вызывать деструкцию клеток, ведущую к некрозу, но и обладают более сложным контакт-зависимым механизмом, способным запускать апоптоз. Примечательно, что биоцидная активность была наиболее выражена у метаболитов *C. glabrata* и *C. krusei*, а не у наиболее патогенного вида кандид — *C. albicans*. По-видимому, это связано с тем, что *C. albicans*, кроме деструктивных ферментов, широко использует дополнительные стратегии и факторы патогенности, позволяющие данному виду до сих пор удерживать лидирующие позиции в списке основных возбудителей оппортунистических микозов [10, 13, 15].

Обнаружение у метаболитов *C. auris* сильно выраженной способности к расщеплению межклеточных контактов в монослое фибробластов указывало на более развитые инвазивные способности данного вида по сравнению с другими кандидами [1]. При анализе данных по биоцидной активности метаболитов *C. auris* было установлено, что большинство исследуемых штаммов не оказывали прямого повреждающего (биоцидного) действия на клетки человека. Это согласуется с исследованием J.L. Brown и соавт. [8], где было показано, что *C. auris* не вызывают воспаление в неповрежденной коже, хотя и способны индуцировать воспалительные реакции при раневых инфекциях и в кровотоке, что подчеркивает опасность этих микроорганизмов в условиях интенсивной терапии.

Заключение

Таким образом, эксперименты показали, что метаболиты кандид могут непосредственно вызывать гибель фибробластов кожи человека, при этом биоцидная активность является штамм-зависимым признаком. Прямая биоцидность в отношении дермальных клеток была наиболее характерна для штаммов *C. glabrata* и *C. krusei*, менее выражена у *C. albicans* и очень слабо — у штаммов *C. auris*. Длительное воздействие метаболитов кандид на клетки человека приводило к гибели фибробластов как через активацию апоптоза, так и путем некроза. Метаболиты некоторых кандид могли расщеплять монослой фибробластов на фрагменты, при этом не была отмечена корреляция между способностью штамма индуцировать гибель отдельных клеток и способностью к разрушению межклеточных связей в культуре. Наибольший деструктивный эффект в отношении монослоя дермальных клеток показали штаммы *C. auris*. Возможно, именно это качество *C. auris*, позволяющее данному виду эффективнее прочих кандид разрушать плотную структуру тканей в организме человека, может служить объяснением их высокой инвазивности.

Список литературы/References

1. Brown J.L., Delaney C., Short B., Butcher M.C., McKloud E., Williams C., Kean R., Ramage G. Candida auris phenotypic heterogeneity determines pathogenicity in vitro. *mSphere, 2020, vol. 5, no. 3: E00371-20. doi: 10.1128/mSphere.00371-20*
2. Calderone R.A., Fonzi W.A. Virulence factors of Candida albicans. *Trends Microbiol., 2001, vol. 9, no. 7, pp. 327–335. doi: 10.1016/s0966-842x(01)02094-7*
3. Du H., Bing J., Hu T., Ennis C.L., Nobile C.J., Huang G. Candida auris: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. *PLoS Pathog., 2020, vol. 16, no. 10: e1008921. doi: 10.1371/journal.ppat.1008921*
4. Eliakim-Raz N., Babaoff R., Yahav D., Yanai S., Shaked H., Bishara J. Epidemiology, microbiology, clinical characteristics, and outcomes of candidemia in internal medicine wards — a retrospective study. *Int. J. Infect. Dis., 2016, vol. 52, pp. 49–54. doi: 10.1016/j.ijid.2016.09.018*
5. Galocha M., Pais P., Cavalheiro M., Pereira D., Viana R., Teixeira M.C. Divergent approaches to virulence in C. albicans and C. glabrata: two sides of the same coin. *Int. J. Mol. Sci., 2019, vol. 20, no. 9: 2345. doi: 10.3390/ijms20092345*
6. Gómez-Gaviria M., Mora-Montes H.M. Current aspects in the biology, pathogeny, and treatment of Candida krusei, a neglected fungal pathogen. *Infect. Drug Resist., 2020, vol. 13, pp. 1673–1689. doi: 10.2147/IDR.S247944*
7. Larkin E., Hager C., Chandra J., Mukherjee P.K., Retuerto M., Salem I., Long L., Isham N., Kovanda L., Borroto-Esoda K., Wring S., Angulo D., Ghannoum M. The emerging pathogen Candida auris: growth phenotype, virulence factors, activity of antifungals, and effect of SCY-078, a novel glucan synthesis inhibitor, on growth morphology and biofilm formation. *Antimicrob. Agents Chemother., 2017, vol. 61: 02396-16. doi: 10.1128/ AAC.02396-16*
8. Lockhart S.R., Etienne K.A., Vallabhaneni S., Farooqi J., Chowdhary A., Govender N.P., Colombo A.L., Calvo B., Cuomo C.A., Desjardins C.A., Berkow E.L., Castanheira M., Magobo R.E., Jabeen K., Asghar R.J., Meis J.F., Jackson B., Chiller T., Litvintseva A.P. Simultaneous emergence of multidrug-resistant Candida auris on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. *Clin. Infect. Dis., 2017, vol. 64, no. 2, pp. 134–140. doi: 10.1093/cid/ciw691*
9. Nett J.E. Candid auris: an emergingpathogen "incognito"? *PLoS Pathog., 2019, vol. 15, no. 4: e1007638. doi: 10.1371/journal.ppat.1007638*
10. Pereira R., dos Santos Fontenelle R.O., de Brito EHS, de Morais S.M. Biofilm of Candida albicans: formation, regulation and resistance. *J. Appl. Microbiol., 2021, vol. 131, no. 1, pp. 11–22. doi: 10.1111/jam.14949*
11. Rossato L., Colombo A.L. Candida auris: what have we learned about its mechanisms of pathogenicity? *Front. Microbiol., 2018, vol. 9: 3081. doi: 10.3389/fmicb.2018.03081*
12. Schelenz S., Hagen F., Rhodes J.L., Abdolrasouli A., Chowdhary A., Hall A., Ryan L., Shackleton J., Trimlett R., Meis J.F., Armstrong-James D., Fisher M.C. First hospital outbreak of the globally emerging Candida auris in a European hospital. *Antimicrob. Resist. Infect. Control., 2016, vol. 5: 35. doi: 10.1186/s13756-016-0132-5*
13. Staniszewska M. Virulence factors in Candida species. *Curr. Protein Pept. Sci., 2020, vol. 21, no. 3, pp. 313–323. doi: 10.2174/1389203720666190722152415*
14. Staniszewska M., Bondaryk M., Zbigniew O. Contribution of aspartic proteases in Candida virulence. Protease inhibitors against Candida infections. *Curr. Protein Pept. Sci., 2017, vol. 18, no. 10, pp. 1050–1062. doi: 10.2174/1389203717666160809155749*
15. Talapko J., Juzbašić M., Matijević T., Pustijanac E., Bekić S., Kotris I., Škrlec I. Candida albicans — the virulence factors and clinical manifestations of infection. *J. Fungi (Basel)., vol. 7, no. 2: 79. doi: 10.3390/jof7020079*

Авторы:

Игнатова Н.И., к.б.н., доцент кафедры эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава РФ, Нижний Новгород, Россия;
Заславская М.И., д.б.н., доцент, профессор кафедры эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава РФ, Нижний Новгород, Россия;
Александрова Н.А., к.б.н., старший преподаватель кафедры эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава РФ, Нижний Новгород, Россия;
Орлова О.Е., к.б.н., руководитель лаборатории микробиологии ГБУЗ Городская клиническая больница № 67 им. Л.А. Ворохобова, Москва, Россия;
Мельников В.Г., к.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия.

Authors:

Ignatova N.I., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Epidemiology, Microbiology and Evidence-Based Medicine, Privolzhsky Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Zaslavskaya M.I., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Professor, Department of Epidemiology, Microbiology and Evidence-Based Medicine, Privolzhsky Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Alexandrova N.A., PhD (Biology), Senior Lecturer, Department of Epidemiology, Microbiology and Evidence-Based Medicine, Privolzhsky Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Orlova O.E., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Microbiology, City Clinical Hospital No. 67 named after L.A. Vorokhobov, Moscow, Russian Federation;
Melnikov V.G., PhD (Medicine), Associate Professor, Leading Researcher, Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after G.N. Gabrichevsky of Rospotrebnadzor, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 15.09.2021
Принята к печати 03.01.2022

Received 15.09.2021
Accepted 03.01.2022

Инфекция и иммунитет
2022, Т. 12, № 2, с. 386–390

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2022, vol. 12, no. 2, pp. 386–390

ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *STREPTOMYCES*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

А.В. Лямин, В.С. Терещенко, А.В. Жестков, Д.Д. Исматуллин

ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия

Резюме. В последнее время как в России, так и во всем мире наблюдается увеличение количества случаев обнаружения представителей кислотоустойчивых микроорганизмов из порядка *Actinomycetales* при развитии бактериальных инфекций у человека. Из данных бактерий наибольшее значение имеют патогены из семейств *Mycobacteriaceae, Nocardiaceae, Gordoniaceae, Tsukamurellaceae, Promicromonosporaceae, Brevibacteriaceae, Streptomycetaceae*. Настоящая статья посвящена анализу распространенности и видового разнообразия представителей семейства *Streptomycetaceae* рода *Streptomyces*, выделенных из клинического материала при обследовании на туберкулез. Нами было проведено изучение 865 посевов проб клинического материала при обследовании на туберкулез, в которых были выявлены признаки роста контаминирующей микрофлоры, а также 316 посевов проб клинического материала при обследовании на туберкулез, в которых были выявлены признаки роста нетуберкулезных микобактерий (НТМ). Материал был собран в период с января 2016 по январь 2019 г. Из проб с признаками роста контаминирующей микрофлоры идентифицировано 1093 штамма микроорганизмов, из проб с признаками роста НТМ — 352 штамма. Из них количество представителей рода *Streptomyces* составило 39 штаммов. Все штаммы стрептомицет были выделены из мокроты. Разнообразие выделенных стрептомицет: *S. phaeochromogenes* (13 штаммов), *S. albus* (1 штамм), *S. avidinii* (1 штамм), *S. badius* (2 штамма), *S. chartreusis* (2 штамма), *S. griseus* (1 штамм), *S. hirsutus* (2 штамма), *S. lavendulae* (3 штамма), *S. violaceoruber* (10 штаммов). Для 4 штаммов не удалось осуществить видовую идентификацию. Анализируя полученные данные, можно сделать заключение об умеренном распространении представителей рода *Streptomyces* в структуре контаминирующей микрофлоры при обследовании на туберкулез. В структуре выделенных микроорганизмов стрептомицеты составили 3,3%. Среди микрофлоры, выделенной из посевов с признаками роста НТМ, стрептомицеты были представлены единичными штаммами. Однако следует отметить, что стрептомицеты оказались доминирующей группой среди кислотоустойчивых актиномицет в структуре контаминирующей микрофлоры и составили 38,3%. С учетом того, что значительная часть из них была выделена в составе микробных ассоциаций, можно сделать вывод о том, что стрептомицеты оказались в данном случае классическими контаминантами. Тем не менее выделение стрептомицет в ассоциациях с клинически значимыми НТМ, на наш взгляд, можно рассматривать как неблагоприятный фактор. Это связано с тем, что среди стрептомицет широко распространены гены антибиотикорезистентности, которые могут быть переданы другим видам микроорганизмов из группы кислотоустойчивых актиномицет, в том числе и микобактериям. Таким образом, клинический материал для диагностики туберкулеза представляет собой интересный объект исследования, поскольку из него могут быть выделены различные представители кислотоустойчивых актиномицет, в том числе и стрептомицеты.

Ключевые слова: *стрептомицеты, микобактерии, клинический материал, туберкулез, идентификация, масс-спектрометрия.*

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

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

Для цитирования:
Лямин А.В., Терещенко В.С., Жестков А.В., Исматуллин Д.Д. Видовое разнообразие представителей рода Streptomyces, выделенных из клинического материала // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 2. С. 386–390. doi: 10.15789/2220-7619-SDA-1838

Citation:
Lyamin A.V., Tereshchenko V.S., Zhestkov A.V., Ismatullin D.D. Species diversity among the genus Streptomyces members isolated from clinical material // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 2, pp. 386–390. doi: 10.15789/2220-7619-SDA-1838

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-SDA-1838

SPECIES DIVERSITY AMONG THE GENUS *STREPTOMYCES* MEMBERS ISOLATED FROM CLINICAL MATERIAL

Lyamin A.V., Tereshchenko V.S., Zhestkov A.V., Ismatullin D.D.

Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, Russian Federation

Abstract. Recently, both in Russia and around the world, the number of cases detecting acid-fast microbial members from the order *Actinomycetales* while developing human bacterial infections has been increased. The most important pathogens in this bacterial order are the members from the families *Mycobacteriaceae*, *Nocardiaceae*, *Gordoniaceae*, *Tsukamurellaceae*, *Promicromonosporaceae*, *Brevibacteriaceae*, *Streptomycetaceae*. This work is devoted to analyzing prevalence and species diversity of representatives of the family *Streptomycetaceae* from the genus *Streptomyces* isolated from clinical material upon examining for tuberculosis. There were examined 865 cultures of clinical material samples while examining for tuberculosis, in which signs of growth of contaminating microflora were revealed, as well as 316 cultures of clinical material samples obtained during examination for tuberculosis, in which signs of growth of non-tuberculosis mycobacteria (NTM) were detected. The material was collected from January 2016 to January 2019. Samples with signs of growth of contaminating microflora allowed to identify 1,093 strains, samples with signs of growth of NTM — 352 strains. Among them, the number of representatives of the genus *Streptomyces* comprised 39 strains. All *Streptomyces* strains were isolated from sputum. Variety of isolated *Streptomyces*: *S. phaeochromogenes* (13 strains), *S. albus* (1 train), *S. avidinii* (1 strain), *S. badius* (2 strains), *S. chartreusis* (2 strains), *S. griseus* (1 strain), *S. hirsutus* (2 strains), *S. lavendulae* (3 strains), *S. violaceoruber* (10 strains). Species identification was not possible for 4 strains. Analyzing the data obtained, it is possible to draw a conclusion about the moderate distribution of representatives of the genus *Streptomyces* in pattern of contaminating microflora while examining for tuberculosis. In pattern structure of isolated microorganisms, *Streptomyces* accounted for 3.3%. Among the microflora isolated from culture with signs of NTM growth, *Streptomyces* was presented by single strains. However, it should be noted that *Streptomyces* was the dominant group among acid-resistant actinomycetes in pattern of contaminating microflora and accounted for 38.3%. Taking into account the fact that a significant proportion of them were isolated as microbial associations, it can be concluded that *Streptomyces* turned out to be classical contaminants in this case. Nevertheless, we believe that the isolation of *Streptomyces* in association with clinically significant NTMs can be considered as an unfavorable factor due to the fact that antibiotic resistance genes are widespread among *Streptomyces* and may be transmitted to other types of microorganisms from the group of acid-resistant actinomycetes, including mycobacteria. Thus, the clinical material examining for tuberculosis is an interesting research object from which various representatives of acid-fast actinomycetes, including *Streptomyces*, can be isolated.

Key words: *Streptomyces, Mycobacterium, clinical material, tuberculosis, identification, mass-spectrometry.*

Стрептомицеты являются важным объектом изучения различных разделов микробиологии и биотехнологии. Широкое распространение данной группы микроорганизмов в природе определило ряд свойств, направленных на выживание представителей рода *Streptomyces* в экстремальных условиях окружающей среды. Известно, что стрептомицеты являются одними из важнейших биопродуцентов различных антибактериальных веществ, многие из которых используются в медицине и ветеринарии [3]. Большинство научных исследований, посвященных данной группе микроорганизмов, были проведены с использованием штаммов, выделенных из различных объектов природных и искусственных мест обитания стрептомицет [2, 4]. С другой стороны, в литературе имеется ряд источников, в которых приводятся данные о возможном участии представителей рода *Streptomyces* в качестве транзиторных обитателей кожных покровов и слизистых оболочек человека. Однако чаще стрептомицеты в качестве представителей нормоценоза организма человека выявляются как случайно [1].

На наш взгляд, данный факт обусловлен отсутствием до недавнего времени доступных методов идентификации стрептомицет в случае выделения их из клинического материала. Благодаря замедленному росту, определенным особенностям культивирования, специфическим культуральным свойствам данной группы микроорганизмов при работе с клиническим материалом стрептомицеты чаще рассматриваются как классические контаминанты, не имеющие клинического значения, особенно с учетом того, что как этиологическая причина патологии человека они практически не рассматриваются. В то же время выделение стрептомицет из клинического материала является важным с точки зрения оценки их свойств и поиска новых антибактериальных агентов, а увеличение в популяции доли иммунокомпрометированных пациентов, особенно в условиях пандемии новой коронавирусной инфекции, неизбежно ставит задачи по поиску новых потенциальных патогенов из числа микроорганизмов, до настоящего времени рассматриваемых в качестве комменсалов, не имеющих клинического значения.

Цель исследования — анализ распространенности и видового разнообразия представителей рода *Streptomyces*, выделенных из клинического материала при обследовании на туберкулез.

Материалы и методы

В работе был проведен анализ 865 посевов проб клинического материала при обследовании на туберкулез, в которых были выявлены признаки роста контаминирующей микрофлоры, а также 316 посевов проб клинического материала при обследовании на туберкулез, в которых были выявлены признаки роста нетуберкулезных микобактерий (НТМ). Посевы клинического материала, включенные в исследование, были собраны в период с января 2016 по январь 2019 года. Во всех пробах представители комплекса *Mycobacterium tuberculosis* отсутствовали. Первичный посев проб клинического материала проводили в соответствии с приказом Минздрава РФ от 21.03.2003 № 109 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации». Из всех посевов, включенных в исследование, с первичных сред (Левенштейна–Йенсена, Финна II и Миддлбрука 7H9 с селективной добавкой PANTA) были проведены пересевы выросших культур на плотные питательные среды: 5% кровяной агар (Bio-Rad, США), универсальную хромогенную среду (Bio-Rad, США), агар Сабуро (HiMedia, Индия). Посевы инкубировались при температуре 37°C в течение 7 суток с последующим культивированием в течение 14 суток при температуре 28°C. Во время инкубации проводился ежедневный просмотр посевов. Все выросшие культуры идентифицировались с помощью MALDI-ToF масс-спектрометра Microflex LT (Bruker, США) методом прямого нанесения, методом расширенного прямого нанесения и методом экстракции муравьиной кислотой в соответствии с рекомендациями производителя оборудования. Из проб с признаками роста контаминирующей микрофлоры было выделено и идентифицировано 1093 штамма микроорганизмов, из проб с признаками роста НТМ — 352 штамма. Клинический материал, посевы которого были включены в исследование, был представлен мокротой, мочой, бронхоальвеолярной лаважной жидкостью, аутопсийным материалом, промывными водами желудка, плевральной жидкостью, спинномозговой жидкостью и раневым отделяемым.

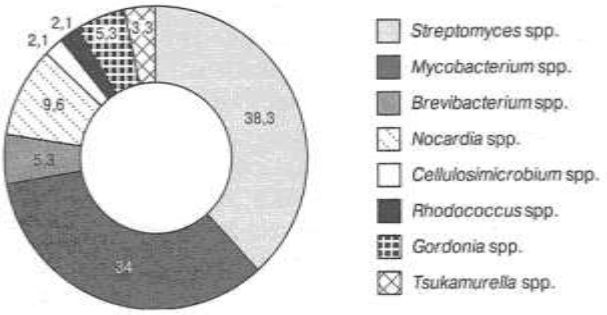

Рисунок. Видовое разнообразие представителей рода *Streptomyces*, выделенных из проб клинического материала, в посевах которого были выявлены признаки контаминации (%)

Figure. Species diversity of representatives of the genus *Streptomyces* isolated from samples of clinical material, which cell culture had signs of contamination (%)

Результаты и обсуждение

Всего в исследовании было выделено и идентифицировано 39 штаммов представителей рода *Streptomyces*. Разнообразие выделенных стрептомицет было представлено следующими видами: *S. phaeochromogenes* (13 штаммов), *S. albus* (1 штамм), *S. avidinii* (1 штамм), *S. badius* (2 штамма), *S. chartreusis* (2 штамма), *S. griseus* (1 штамм), *S. hirsutus* (2 штамма), *S. lavendulae* (3 штамма), *S. violaceoruber* (10 штаммов). Для 4 штаммов не удалось осуществить видовую идентификацию.

С учетом специфических культуральных свойств, характерных для стрептомицет, большинство штаммов было выделено из посевов клинического материала с признаками контаминации (36 штаммов). Из посевов клинического материала с признаками роста НТМ было выделено всего 3 штамма. Важно отметить, что стрептомицеты наряду с НТМ были доминирующей группой среди кислотоустойчивых актиномицет, выделенных из клинического материала с признаками контаминирующего роста (рис.).

При анализе распространенность стрептомицет в контаминирующей микрофлоре была выявлена еще одна закономерность. Для стрептомицет, больше чем для других видов кислотоустойчивых актиномицет оказались характерны ассоциации с другими контаминантами. Было выявлено 6 случаев двухкомпонентных ассоциаций: в трех случаях была выявлена ассоциация стрептомицет с нетуберкулезными микобактериями (две ассоциации *S. lavendulae* + *M. chelonae*, одна — *S. hirsutus* + *M. celatum*), в двух случаях была выявлена ассоциация, состоящая из двух видов стрептомицет (*S. badius* + *S. griseus*, *S. violaceoruber* + *S. phaeochromogenes*), один штамм *S. chartreusis* был выделен в ассоциации с *B. atrophaeus*. Схожие результаты были получены при анализе структуры стрептомицет, выделенных из посевов клинического материала с признаками роста НТМ. В одном случае была

выделена трехкомпонентная ассоциация с двумя видами микобактерий (*M. pseudoshottsii* + *M. szulgai* + *S. lavendulae*), в одном случае была выделена двухкомпонентная ассоциация, также с НТМ (*M. fortuitum* + *S. phaeochromogenes*), один штамм *S. hirsutus* был выделен в монокультуре.

При анализе сред, на которых был выявлен рост стрептомицет, можно сделать вывод, что плотные питательные среды на яичной основе (Левенштейна–Йенсена и Финна II) не являются оптимальными для выделения данной группы микроорганизмов из первичного клинического материала. На среде Левенштейна–Йенсена не было выделено ни одного штамма представителей рода *Streptomyces*, на среде Финна II был получен рост 2 штаммов стрептомицет. Все остальные штаммы были выделены с жидкой питательной среды Миддлбрука 7H9 с селективной добавкой PANTA. При последующих пересевах рост всех выделенных штаммов стрептомицет был отмечен на кровяном агаре. Универсальная хромогенная среда оказалась менее пригодной для культивирования стрептомицет. Возможно, данный факт обусловлен тем, что среды с избытком нативного белка и аминокислот содержат вещества, которые оказывают лимитирующее воздействие на рост стрептомицет.

Анализируя полученные данные, можно сделать вывод об умеренном распространении представителей рода *Streptomyces* в структуре контаминирующей микрофлоры при обследовании на туберкулез. В структуре выделенных микроорганизмов стрептомицеты составили 3,3%. Среди микрофлоры, выделенной из посевов с признаками роста НТМ, стрептомицеты были представлены единичными штаммами. Однако следует отметить, что стрептомицеты оказались доминирующей группой среди кислотоустойчивых актиномицет в структуре контаминирующей микрофлоры и составили 38,3%. С учетом того, что значительная часть из них была выделена в составе микробных ассоциаций, можно сделать заключение о том, что стрептомицеты оказались в данном случае классическими контаминантами. Тем не менее выделение стрептомицет в ассоциациях с клинически значимыми НТМ можно рассматривать, на наш взгляд, как неблагоприятный фактор, так как среди стрептомицет широко распространены гены антибиотикорезистентности, которые могут быть переданы другим видам микроорганизмов из группы кислотоустойчивых актиномицет, в том числе и микобактериям.

Среди выделенных видов стрептомицет преобладающими оказались представители *S. phaeochromogenes* и *S. violaceoruber*, которые в совокупности составили 59,0% всех выделенных штаммов. Остальные виды были представлены единичными (от 1 до 3) штаммами. *S. phaeochromogenes* описан в литературе как вид, представители которого продуцируют значительное количество разнообразных веществ с антимикробной активностью [6]. При этом в научной литературе отсутствуют данные о его клиническом значении и об особенностях биологических свойств штаммов, выделенных из клинического материала. *S. violaceoruber* по данным литературы обладает меньшим набором веществ с антимикробной активностью [5].

Таким образом, клинический материал для диагностики туберкулеза представляет собой интересный объект исследования, поскольку из него могут быть выделены различные представители кислотоустойчивых актиномицет, в том числе и стрептомицеты. Бактерии рода *Streptomyces* могут представлять определенный интерес для специалистов в различных областях микробиологии, как с целью поиска новых антибактериальных и других биологически активных веществ, так и с точки зрения оценки потенциального клинического значения выделенных штаммов, особенно у иммунокомпрометированных пациентов. Дополнительной сферой интереса может быть анализ влияния стрептомицет на рост трудно культивируемых микроорганизмов, например хеликобактеров, кампилобактеров (при заболеваниях желудочно-кишечного тракта), возбудителей бронхолегочной патологии и ряда других, для выделения которых используются селективные среды, что обусловлено возможностью подавления анализируемой микрофлоры антибактериальными веществами, активно выделяемыми стрептомицетами.

Список литературы/References

1. Андриянова И.В., Казакова О.Э., Шервашидзе С.В., Вахрушев С.Г., Каширцева И.А., Шульмин А.В. Изучение микрофлоры носоглотки здоровых детей в различных возрастных группах по микробным маркерам // Российская ринология. 2018. Т. 26, № 3. С. 47–53. [Andriyanova I.V., Kazakova O.E., Shervashidze S.V., Vahrushev S.G., Kashirceva I.A., Shulmin A.V. The study of the microflora of the nasopharynx of healthy children in different age groups by microbial markers. *Rossiyskaya rinologiya = Russian Rhinology, 2018, vol. 26, no. 3, pp. 47–53. (In Russ.)*]
2. Виноградов К.А., Булгаков В.Г., Полин А.Н. Стрептомицеты в свете концепции «многоклеточности» бактерий // Антибиотики и химиотерапия. 2016. Т. 61, № 7–8. С. 33–47. [Vinogradov K.A., Bulgakov V.G., Polin A.N. Streptomycetes in the light of the concept of "multicellularity" of bacteria. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy, 2016, vol. 61, no. 7–8, pp. 33–47. (In Russ.)*]

3. Илич С.Б., Константинович С.С., Тодорович З.Б., Лазич М.Л., Велькович В.Б., Йокович Н., Радованович Б.Ц. Биоактивные метаболиты из изолятов стрептомицетов — описание и антимикробная активность // Микробиология. 2007. № 4. С. 480–487. [Ilich S.B., Konstantinovich S.S., Todorovich Z.B., Lazich M.L., Vel'kovich V.B., Yokovich N., Radovanovich B.Ts. Bioactive metabolites from streptomycete isolates – description and antimicrobial activity. *Mikrobiologiya = Mikrobiologiya (Microbiology), 2007, no. 4, pp. 480–487. (In Russ.)*]
4. Омургазиева Ч.М., Каулбекова А.А. Фенотипические свойства штаммов Streptomyces, выделенных из почв естественных и техногенных зон Кыргызстана // Вестник Кыргызского национального университета имени Жусупа Баласагына. 2017. Т. 4, № 92. С. 32–41. [Omurgazieva Ch.M., Kaulbekova A.A. Phenotypic properties of Streptomyces strains isolated from soils of natural and technogenic zones of Kyrgyzstan. *Vestnik Kyrgyzskogo natsionalnogo universiteta imeni Zhusupa Balasagyna = Bulletin of the Kyrgyz National University named after Zhusup Balasagyn, 2017, vol. 4, no. 92. pp. 32–41. (In Russ.)*]
5. Duangmal K., Ward A.C., Goodfellow M. Selective isolation of members of the Streptomyces violaceoruber clade from soil. *FEMS Microbiol. Lett., 2005, vol. 245, no. 2, pp. 321–327. doi: 10.1016/j.femsle.2005.03.028*
6. Ritacco F.V., Eveleigh D.E. Molecular and phenotypic comparison of phaeochromycin-producing strains of Streptomyces phaeochromogenes and Streptomyces ederensis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2008, vol. 35, no. 9, pp. 931–945. doi: 10.1007/s10295-008-0367-0*

Авторы:

Лямин А.В., д.м.н., профессор кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;

Терещенко В.С., старший лаборант кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;

Жестков А.В., д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, зав. кафедрой общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;

Исматуллин Д.Д., ассистент кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия.

Authors:

Lyamin A.V., PhD, MD (Medicine), Professor, 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;

Tereshchenko V.S., Head Technician, 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;

Zhestkov A.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Honored Worker of Science of the Russian Federation, Head 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;

Ismatullin D.D., Assistant, 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.

Поступила в редакцию 07.12.2021
Принята к печати 28.01.2022

Received 07.12.2021
Accepted 28.01.2022

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2022, vol. 12, no. 2, pp. 391–396

Инфекция и иммунитет
2022, Т. 12, № 2, с. 391–396

ПОЛУЧЕНИЕ ИММУНОДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ИЗ АНТИГЕНОВ *TOXOCARA CANIS* ДЛЯ СЕРОДИАГНОСТИКИ ТОКСОКАРОЗА У ЧЕЛОВЕКА

И.В. Канина, А.И. Новак, М.Д. Новак, О.В. Евдокимова

ФГБОУ ВО Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, г. Рязань, Россия

Резюме. Токсокароз — гельминтозная инвазия человека, имеющая широкий круг хозяев с эпизоотическим распространением. Серопозитивность населения в странах с умеренным климатом составляет около 37%, в регионах с тропическим — до 92%. Практически все возрастные группы населения подвержены риску инвазии токсокарами. Иммунологический метод в настоящее время сохраняет диагностическое значение для токсокароза, так как реакция иммунной системы на гельминтов сопровождается формированием сенсибилизации, а техники и способы отбора клинического материала для выявления миграционной формы токсокароза у человека являются трудоемкими и инвазивными. Цель настоящего исследования — разработка иммунобиологического препарата на основе экскреторно-секреторных антигенов личинок *Toxocara canis* для серодиагностики синдрома larva migrans у человека в реакциях иммуноферментного анализа. Антигены получали из личинок *Toxocara canis* путем культивирования яиц, выделенных из маток самок нематод в питательной среде с глютамином. Очистку препарата от балластных веществ проводили центрифугированием при 8000g в течение 20 минут с последующей фильтрацией через микрофильтрационную мембрану с диаметром пор 0,05–0,15 мкм типа МФАС-П-1 (ЗАО НТЦ «Владипор»). Для выявления антител к токсокарам тестировали сыворотки крови добровольцев — студентов из стран, где частота заболеваемости токсокарозом остается высокой. Для отбора серопозитивных и серонегативных сывороток использовали иммуноферментный анализ с коммерческими антигенами тест-системы «Токсокара-IgG-ИФА-БЕСТ», которую также использовали в качестве контроля. Диагностические антигенные препараты готовили с разной концентрацией белка для исследования серопозитивных сывороток и определения оптимальной дозы антигенного препарата. *Результаты.* В иммуноферментном анализе с использованием стандартной тест-системы из 250 исследованных проб, токсокара-IgG-антитела выявлены в 20 сыворотках (8%), что свидетельствует об антигенной стимуляции иммунной системы гельминтами и, возможно, о ранее перенесенном заболевании. В ИФА с опытными образцами антигенов количество серопозитивных проб коррелировало с концентрацией белка в антигенных препаратах: при концентрации 1,96 мкг/мл выявлено 5,2% положительных результатов, 1,71 мкг/мл — 3,2%, 0,33 мкг/мл — 0,8% (коэффициент корреляции Пирсона = 0,94). Количество серопозитивных сывороток, выявленных коммерческим антигеном стандартной тест-системы ИФА, совпало с количеством положительных сывороток при использовании опытного образца антигена с концентрацией белка 2,49 мкг/мл. Таким образом, полученные в результате экспери-

Адрес для переписки:
Канина Ирина Владимировна
390026, Россия, г. Рязань, Высоковольтная ул., 9,
ФГБОУ ВО Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова.
Тел.: 8 920 630-02-27.
E-mail: kanina.irina1987@yandex.ru

Contacts:
Irina V. Kanina
390026, Russian Federation, Ryazan, Vysokovoltnaya str., 9,
Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov.
Phone: +7 920 630-02-27.
E-mail: kanina.irina1987@yandex.ru

Для цитирования:
Канина И.В., Новак А.И., Новак М.Д., Евдокимова О.В. Получение иммунодиагностических препаратов из антигенов Toxocara canis для серодиагностики токсокароза у человека // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 2. С. 391–396. doi: 10.15789/2220-7619-OID-1804

Citation:
Kanina I.V., Novak A.I., Novak M.D., Evdokimova O.V. Obtaining immunodiagnostic preparations from Toxocara canis antigens for serodiagnostics of toxocariasis in human // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 2, pp. 391–396. doi: 10.15789/2220-7619-OID-1804

Исследования выполнены на средства гранта для молодых ученых ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (договор № 2/21 от 11.01.2021 г.).
The research was supported by a grant for young scientists from the Ryazan State Medical University of the Ministry of Health of Russia (contract No. 2/21, January 11, 2021).

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-OID-1804

мента иммунодиагностические препараты на основе экскреторно-секреторных антигенов *Toxocara canis* характеризуются высокой чувствительностью и могут быть использованы для выявления токсокара-IgG-антител в иммуноферментном анализе. Концентрация белка в антигенном препарате не менее 2,49 мкг/мл является оптимальной и по чувствительности совпадает с коммерческим антигеном стандартной тест-системы.

Ключевые слова: *токсокароз, иммунодиагностика, экскреторно-секреторный антиген, иммуноферментный анализ, личинки, диагностикум.*

OBTAINING IMMUNODIAGNOSTIC PREPARATIONS FROM *TOXOCARA CANIS* ANTIGENS FOR SERODIAGNOSTICS OF TOXOCARIASIS IN HUMAN

Kanina I.V., Novak A.I., Novak M.D., Evdokimova O.V.

Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov, Ryazan, Russian Federation

Abstract. Toxocariasis is a human helminthic invasion that has a wide range of hosts with epizootic distribution. The populational seropositivity in countries with a temperate climate comprises about 37%, whereas in regions with tropical climate — up to 92%. Almost all age groups of the population are at risk of invasion by toxocars. The immunological method currently retains diagnostic significance for toxocariasis, because the reaction of immune system against helminths is accompanied by developing sensitization, and techniques as well as methods of collecting clinical material to identify the migratory form of toxocarosis in humans are time-consuming and invasive. The purpose of this study is to develop an immunobiological preparation based on excretory-secretory antigens from *Toxocara canis* larvae for serodiagnostics of larva migrans syndrome in human by using enzyme-linked immunoassay (ELISA). Antigens were obtained from *Toxocara canis* larvae by culturing its eggs isolated from the uterus of female nematodes in the glutamine-supplemented medium. The preparation was purified from ballast substances by centrifugation at 8000 g for 20 minutes followed by filtration through microfiltration membrane with a pore diameter of 0,05–0,15 microns, type MFAS-P-1 (manufactured by CJSC STC Vladipor). Blood serum of student volunteers from countries with high incidence rate of toxocariasis were tested to detect *T. canis*-specific antibodies. ELISA with commercial antigens Toxocara-IgG-ELISA-BEST kit was used for selection of seropositive and seronegative sera also used as a control. Diagnostic antigenic preparations with different protein concentrations were prepared to examine seropositive sera for determining optimal dose of the antigenic drugs. *Results.* ELISA with standard test kit allowed to detect Toxocara-IgG antibodies in 20 sera (8%) from 250 samples, what indicates about antigenic stimulation of the immune system by helminths and suspected former disease. Analyzing experimental samples allowed to find the number of seropositive data correlated with antigenic protein concentration in preparations: at a concentration of 1,96 μg/ml 5,2% of positive results were detected, 1,71 μg/ml — 3.2%, 0.33 μg/ml — 0.8% (Pearson's correlation coefficient 0,94). The number of positive sera detected with commercial antigen in ELISA kit was identical to that of positive sera detected by an experimental antigen sample with a protein concentration of 2,49 μg/ml. Thus, the immunodiagnostic preparations obtained by the experimental method based on the excretory-secretory antigens from *Toxocara canis* are characterized by high sensitivity and can be used to detect Toxocara-IgG antibodies in ELISA. The antigen preparation protein concentration of at least 2.49 μg/ml is optimal and correlates whit sensitivity of the commercial antigen of the standard ELISA.

Key words: *toxocariasis, immunodiagnostics, excretory-secretory antigen, linked immunosorbent assay, larvae, diagnosticum.*

Введение

Токсокароз — гельминтозная инвазия человека, имеющая широкий круг хозяев с эпизоотическим распространением. Серопозитивность населения в странах умеренного пояса составляет около 37%, на территориях с тропическим климатом — до 92%. Риску инвазии подвержены практически все возрастные группы населения [1].

Заражение человека происходит алиментарно при попадании инвазионных яиц токсокар от млекопитающих семейств *Canidae* или *Felidae* в продукты питания, питьевую воду, а также при несоблюдении гигиенических мер при контакте с животными, преимущественно щенками и котятами. В тонком кишечнике человека из инвазионных яиц освобождаются личинки, которые через слизистые оболочки кишечника проникают в кровоток и мигрируют в органы и ткани, вызывая миграционную форму токсокароза — синдром larva migrans. Часть личинок задерживается в легких и паренхиматозных органах, окружается реактивно-измененными тканями с формированием паразитарных гранулем. Особенности иммунного ответа при инфицировании токсокарами обусловлены характером взаимоотношений «паразит–хозяин», спецификой онтогенеза и антигенной структурой нематод. В развитии инвазионного процесса особую роль играяют гуморальные факторы защиты организма, что определяет подходы к диагностике инвазии у человека [2]. «Адаптационная толерантность» гельминтов приводит к уменьшению иммунореактивности организма и, как следствие, снижению напряженности иммунитета. Сенсибилизирующее действие метаболических антигенов определяет иммунопатогенез с развитием неспецифичной и полиморфной клинической картины.

Иммунологический метод в настоящее время сохраняет преимущественное диагностическое значение при синдроме larva migrans, так как реакция иммунной системы на антигены гельминтов сопровождается формированием сенсибилизации, а техники и способы отбора клинического материала для выявления миграционной формы токсокароза у человека трудоемкие и инвазивные.

Разработкой иммунодиагностических тестов при токсокарозе занимались российские и зарубежные ученые в ветеринарной и медицинской практике [6, 7, 8, 9]. Тем не менее используемые в ветеринарии иммунореагенты недостаточно адаптированы для диагностики миграционной формы токсокароза у человека, иммунореагенты на основе тканевых компонентов токсокар дают перекрестные реакции с антигенными детерминантами гельминтов близких в филогенетическом отношении родов. Наиболее специфичными для иммунодиагностики токсокароза у человека являются экскреторно-секреторные антигены личинок токсокар. Коммерческий набор «Токсокара-IgG-ИФА-БЕСТ» позволяет провести ретроспективный анализ инвазии токсокарами, но мало пригоден для выявления миграционной формы токсокароза [7].

В ходе разработки иммунодиагностических препаратов на основе экскреторно-секреторных антигенов токсокар нами ранее были отработаны и модифицированы условия культивирования личинок. Изучено влияние дезинфицирующих веществ на эмбриональное развитие *Toxocara canis in vitro* [4, 5].

Цель настоящего исследования — разработка иммунобиологического препарата на основе экскреторно-секреторных антигенов личинок *Toxocara canis* для серодиагностики синдрома larva migrans у человека в реакции иммуноферментного анализа.

Материалы и методы

Исследования проведены в 2019–2020 гг. на базе кафедры микробиологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Экскреторно-секреторные антигены получали при культивировании личинок токсокар в питательной среде, содержащей 16 г 1%-ного глутамина, 500 тыс. ЕД нистатина и 2,5 мг гентамицина [6]. Яйца выделяли из маток половозрелых самок, полученных после дегельминтизации трех-четырехмесячных щенков свободного выгула. Эмбриональное развитие контролировали с использованием бинокулярного микроскопа «Микмед-5» (ЛОМО, Санкт-Петербург, Россия) при увеличении ок. 15 × об. 10. Выход личинок из яиц обеспечивали воздействием раствора панкреатина (240 ЕД/мл) в термостате ТС-1/20 СПУ. Отмывание антигенов от балластных веществ производили на центрифуге J2-HS Beckman Coulter.

Оценка стерильности полученных антигенных препаратов проведена ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Рязанской области согласно «Государственной фармакопее РФ» в соответствии с СанПин 2.1.3.2630-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность». Все предоставленные образцы антигенов стерильны и безопасны (протокол лабораторных исследований № 4414 от 14.04.2021).

Для каждой партии препарата определяли оптическую плотность на спектрофотометре СФ-2000 с последующим расчетом концентрации белка по формуле Калькара (ОФС 1.2.300.12 «Определение белка спектрофотометрическим методом»).

Верификация диагностической значимости приготовленных антигенных препаратов производилась методом параллельного тестирования 250 сывороток крови от клинически здоровых студентов-добровольцев ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием полистироловых планшетов, сенсибилизированных опытными образцами антигенов токсокар, и стандартизированной тест-системы «Токсокара-IgG-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия) [3, 7].

Для аспирации исследуемых образцов и последующей промывки применяли автоматический вошер Wellwash Versa (Thermo Fisher Scientific, США). Учет результатов ИФА проводили с помощью ImmunoChem-2100 Microplate Reader [3].

Результаты и обсуждение

Отработка параметров культивирования личинок токсокар и получения антигена

Антиген получали самостоятельно при культивировании личинок *Toxocara canis* в глютамин-содержащей питательной среде. Для выделения яиц у самок токсокар отпрепаровывали матку. Яйца из матки освобождали путем гомогенизирования в фарфоровой ступке с добавлением 1 мл физиологического раствора. Суспензию с яйцами помещали в чашки Петри с питательной средой.

Яйца культивировали в течение 30 дней при комнатной температуре, естественном освещении, в аэробных условиях. Формирование жизнеспособных личинок наблюдали на 21 день культивирования. По истечении срока инкубации около 60% личинок самостоятельно осво-

бождались от яйцевых оболочек. Культуральную среду с личинками четырехкратно пропускали через металлические фильтры до полного очищения от остатков волокон матки. Полученную суспензию центрифугировали при 2000 g в течение 10 минут с последующим удалением супернатанта. Осадок, содержащий личинки, двукратно отмывали физиологическим раствором при 1000g в течение 10 минут и использовали для получения экскреторно-секреторных антигенов.

Оставшаяся часть яиц для растворения яйцевых оболочек подвергалась воздействию панкреатина. Суспензию с инвазионными яйцами культивировали в аппарате Бермана в условиях термостата при температуре 37°С в течение суток для выхода жизнеспособных личинок из яйцевых оболочек и последующей миграции через слои марли на дно пробирки. Осевших на дно пробирки личинок отмывали забуференным физиологическим раствором от панкреатина путем центрифугирования при скорости 500g в течение 10 минут. Осадок с поверхности марли в аппарате Бермана исследовали микроскопическим методом на наличие яиц токсокар. При наличии яиц с живыми личинками материал повторно подвергали воздействию панкреатина.

Полученных личинок культивировали трое суток в глютамин-содержащей среде при температуре 37°С с ежедневным контролем их жизнеспособности. После гибели личинок экскреторно-секреторные антигены отделяли от балластных веществ путем центрифугирования при 8000g в течение 20 мин до полного просветления надосадка.

Супернатант в асептических условиях пропускали через бактериальные фильтры МФАС-П-1, разливали в стерильные флаконы объемом 5 мл, плотно закрывали резиновыми пробками и замораживали. В таких условиях при соблюдении полной герметичности экскреторно-секреторный антиген может сохранять свою активность длительное время.

В процессе культивирования разных партий личинок получено 13 образцов экскреторно-секреторных антигенов. Каждый образец после проверки флакона на целостность и эффективность герметизации контролировали на санитарно-микробиологическую чистоту.

Тестирование полученных иммунодиагностических препаратов

Для оценки диагностической ценности полученных антигенных препаратов в каждом образце определяли оптическую плотность и концентрацию белка. Показатели концентрации белка в зависимости от экстинкции исследуемого образца представлены в табл. 1. Максимальной концентрацией белка (2,49 мкг/мл) отличались образцы № 3–6, 8–13.

Все полученные образцы антигена использовали для сенсибилизации иммунологических планшетов и дальнейшей постановки ИФА. Антигены иммобилизировали в лунках полистиролового планшета путем «пассивной сорбции» в течение 60 минут при температуре 37°С. Отрицательным и положительным контролем служили стандартные тест-сыворотки из набора «Токсокара-IgG-ИФА-БЕСТ».

Сыворотки крови от клинически здоровых студентов-добровольцев из тропических стран, где частота заболеваемости токсокарозом по литературным данным стабильно высокая,

Таблица 1. Зависимость концентрации белка в опытных образцах от величины оптической плотности
Table 1. A relation between protein concentration in the test samples and optical density

Длина волны, нм Wavelength, nm	260	280	480	580	680	780	Концентрация белка, мкг/мл Protein concentration, µg/ml
№ образца Sample number	Величина оптической плотности Magnitude of optical density						
1	3,0852	2,7777	2,9205	3,0549	2,5386	1,6221	1,960683
2	3,0075	2,5799	2,9545	3,1549	2,9247	1,9445	1,713145
3	3,1549	3,1549	3,1549	3,1549	2,0202	1,2351	2,492371
4	3,1549	3,1549	3,1549	1,9695	1,0935	0,6620	2,492371
5	3,1549	3,1549	3,1549	2,5982	1,518	1,6241	2,492371
6	3,1549	3,1549	3,1549	2,5796	1,6853	1,2472	2,492371
7	3,1549	1,7647	0,5606	0,2220	0,1126	0,0883	0,337561
8	3,1549	3,1549	1,4937	0,9530	0,6762	0,4937	2,492371
9	3,1549	3,1549	2,8857	1,9136	1,4494	1,1684	2,492371
10	3,1549	3,1549	2,3133	1,5725	1,2850	1,0904	2,492371
11	3,1549	3,1549	2,3133	1,5725	1,2850	1,0904	2,492371
12	3,1549	3,1549	2,3987	2,1996	1,8691	1,4774	2,492371
13	3,1549	3,1549	3,1549	3,1526	2,9550	2,8658	2,492371

тестировали на наличие антител к токсокарам параллельно в стандартной тест-системе АО «Вектор-Бест» и с использованием экспериментальных партий антигенов.

Результаты иммуноферментного анализа с использованием стандартной тест-системы показали 20 серопозитивных проб из 250 — 8%. При постановке ИФА с опытными образцами антигенов количество серопозитивных проб коррелировало с концентрацией белка в антигенных препаратах. Результаты представлены в табл. 2.

При низких концентрациях белка выявлено меньшее количество серопозитивных проб по сравнению со стандартной тест-системой: 1,96 мкг/мл — 5,2%, 1,71 мкг/мл — 3,2%, 0,33 мкг/мл — 0,8% (коэффициент корреляции Пирсона — 0,94). При сенсибилизации иммунологических планшетов образцами антигена с концентрацией белка 2,49 мкг/мл количество положительных результатов совпало с показателями ИФА в стандартной тест-системе.

Основными характеристиками диагностического препарата являются степень его чувствительности, специфичности и воспроизводимости результатов. Указанные свойства можно оценить по способности препарата выявлять как положительные, так и отрицательные результаты при серологическом исследовании крови пациентов. Для исключения перекрестных реакций между нематодами разных родов целесообразно использование экскреторно-секреторных компонентов с высокой молекулярной массой, что подтверждается другими исследователями [6, 7, 8].

Уровень специфичности тест-системы определяется опытным путем при рандомном исследовании сывороток крови пациентов с наибольшей степенью вероятности заболевания.

Все обследованные в ходе эксперимента люди принадлежат к группе высокого риска, так как согласно эпидемиологическим данным в странах тропического пояса уровень инвазирования населения токсокарами достаточно высок [1]. Наиболее часто миграционная форма токсокароза встречается в детском возрасте. Выявление токсокара-IgG-антител в 20 сыворотках (8%) свидетельствует об антигенной стимуляции иммунной системы гельминтами и ранее перенесенном заболевании.

Достоверность результатов при иммунодиагностике токсокароза у человека обеспечивается специфичностью и чистотой антигенных фракций диагностического препарата. В ряде экспериментов в серологических реакциях применяли соматические антигены токсокар от взрослых особей [8, 9]. Однако они обладают низкой специфичностью и показывают ложноположительные результаты при паразитировании других нематод.

Высокой диагностической значимостью при миграционной форме токсокароза характеризуются серологические тесты с использованием экскреторно-секреторных антигенов личиночных стадий. Причем концентрация белка в диагностическом препарате играет ведущую роль в выборе образца, пригодного для постановки иммунодиагностических реакций.

Антитела к экскреторно-секреторным антигенам и циркулирующие иммунные комплексы после завершения инвазионного процесса могут длительное время сохраняться в организме человека. Подтверждение диагноза «токсокароз» возможно при достижении диагностического титра и наличии патогномоничной симптоматики. Положительные результаты ИФА (наличие иммуноглобулинов класса G) при отсутствии явной клинической симптоматики могут свидетельствовать о перенесенном в анамнезе токсокарозе или недавней элиминации гельминтов из организма.

Как подтверждающая методика при диагностике токсокароза у человека используется иммуноблоттинг в тест-системе TOXOCARA Western Blot IgG. В качестве мишеней в этом тесте выступают белки со сложной структурой, что позволяет точно дифференцировать на-

Таблица 2. Количество серопозитивных сывороток крови при использовании опытных образцов антигена с различной концентрацией белка

Table 2. The number of seropositive blood serum samples after using test antigen samples at varying protein concentrations

№ образца Sample number	**Концентрация белка, мкг/мл** Protein concentration, µg/ml	**Количество серопозитивных результатов** Number of seropositive results	**Количество серонегативных результатов** Number of seronegative results
1	1,960683	13	237
2	1,713145	8	242
3	2,492371	20	230
4	2,492371	20	230
5	2,492371	20	230
6	2,492371	20	230
7	0,337561	2	248
8	2,492371	20	230
9	2,492371	20	230
10	2,492371	20	230
11	2,492371	20	230
12	2,492371	20	230
13	2,492371	20	230

личие антительного ответа на специфические и неспецифические детерминанты нематод [7]. Однако надо учитывать, что вестерн-блот достаточно трудоемкий и дорогостоящий метод диагностики гельминтозных инвазий.

Для диагностики токсокароза у человека наиболее удобным в использовании, унифицированным и быстрым скрининговым методом является ИФА. Эта реакция сочетает сохранение стабильности всех компонентов системы в течение рекомендуемого срока использования, высокую чувствительность и легкость в интерпретации результатов.

Заключение

Таким образом, полученные в результате эксперимента иммунодиагностические препараты на основе экскреторно-секреторных антигенов личинок *Toxocara canis* характеризуются высокой чувствительностью и могут быть использованы для выявления токсокара-IgG антител в иммуноферментном анализе у человека. Концентрация белка в антигенном препарате не менее 2,49 мкг/мл является оптимальной и по чувствительности совпадает с коммерческим антигеном стандартной тест-системы.

Список литературы/References

1. Адаменко Г.П., Никулин Ю.Т. Токсокароз — актуальная проблема здравоохранения // Медицинские новости. 2004. № 2. С. 31–36. [Adamenko G.P., Nikulin Yu.T. Toxocariasis is an urgent problem of public health. *Meditsinskie novosti = Medical News, 2004, no. 2, pp. 31–36. (In Russ.)*]
2. Даугалиева Э.Х. Иммунитет при гельминтозах // Труды ВИГИС. 2000. Т. 36. С. 27–49. [Daugalieva E.Kh. Immunity in helminthiasis. *Trudy VIGIS = Works of All-Russian Scientific Research Institute for Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plant, 2000, vol. 36, pp. 27–49. (In Russ.)*]
3. Иванская Н.В., Кислых Е.Н., Максименок Е.В., Раевская Г.Е., Пилипенко В.Г. Практическое пособие по иммуноферментному анализу. Киев: Диапроф-Мед, 2003. С. 54–68. [Ivanskaya N.V., Kislykh E.N., Maksimenok E.V., Raevskaya G.E., Pilipenko V.G. A practical guide to enzyme immunoassay. *Kiev: Diaprof-Med, 2003. Pp. 54–68. (In Russ.)*]
4. Канина И.В., Новак А.И., Евдокимова О.В. Овицидная активность дезинфицирующих средтсв в отношении яиц Toxocara canis // Проблемы медицинской микологии. 2021. Т. 23, № 2. С. 86–87. [Kanina I.V., Novak A.I., Evdokimova O.V. Ovicidal activity of disinfectants against Toxocara canis eggs. *Problemy meditsinskoy mikologii = Problems of Medical Mycology, 2021, vol. 23, no. 2, pp. 86–87. (In Russ.)*]
5. Канина И.В., Новак А.И., Новак М.Д., Евдокимова О.В. Подбор оптимальных доз антимикробных препаратов при культивировании личинок Toxocara canis // Проблемы медицинской микологии. 2020. Т. 22, № 3. С. 85–86. [Kanina I.V., Novak A.I., Novak M.D., Evdokimova O.V. Selection of optimal doses of antimicrobial drugs in the cultivation of Toxocara canis larvae. *Problemy meditsinskoy mikologii = Problems of Medical Mycology, 2020, vol. 22, no. 3, pp. 85–86. (In Russ.)*]
6. Новак М.Д., Солопов П.А. Иммуноферментный анализ и реакция непрямой гемагглютинации для диагностики имагинального и ларвального токсокароза собак // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. 2009. № 10. С. 286–287. [Novak M.D., Solopov P.A. Immunoassay and indirect hemagglutination reaction for the diagnosis of imaginal and larval toxocariasis in dogs. *Teoriya i praktika borby s parazitarnymi bolezniami = Theory and Practice of Combating Parasitic Diseases, 2009, no. 10, pp. 286–287. (In Russ.)*]
7. Новиков П.Д., Никулин Ю.Т., Хотетовская Ж.В., Новиков Д.К. Иммунодиагностика токсокароза // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2007. № 2. С. 65–72. [Novikov P.D., Nikulin Yu.T., Hotetovskaya Zh.V., Novikov D.K. Immunodiagnosis of toxocariasis. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology, 2007, no. 2, pp. 65–72. (In Russ.)*]
8. Annen J.M., Eckert J., Hess U. Simple method for obtaining Toxocara canis antigen for the indirect immunofluorescence technic [In German]. *Acta Trop., 1975, vol. 1, no. 3, pp. 37–47.*
9. Zarnowska-Prymek H. Enhancement of laboratory diagnosis specificity in human toxocariasis [In Polish]. *Wiad. Parazytol, 2001, vol. 47, no. 3, pp. 489–496.*

Авторы:

Канина И.В., аспирант кафедры микробиологии ФГБОУ ВО Рязанский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова, г. Рязань, Россия;

Новак А.И., д.б.н., доцент, профессор кафедры микробиологии ФГБОУ ВО Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, г. Рязань, Россия;

Новак М.Д., д.б.н., профессор, профессор кафедры эпидемиологии ФГБОУ ВО Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, г. Рязань, Россия;

Евдокимова О.В., к.м.н., доцент, зав. кафедрой микробиологии ФГБОУ ВО Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, г. Рязань, Россия.

Authors:

Kanina I.V., PhD Student, Department of Microbiology, Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov, Ryazan, Russian Federation;

Novak A.I., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Professor of the Department of Microbiology, Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov, Ryazan, Russian Federation;

Novak M.D., PhD, MD (Biology), Professor, Professor of the Department of Epidemiology, Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov, Ryazan, Russian Federation;

Evdokimova O.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Microbiology, Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov, Ryazan, Russian Federation.

Поступила в редакцию 11.10.2021
Принята к печати 03.01.2022

Received 11.10.2021
Accepted 03.01.2022

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. Appletion & 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

Иллюстрация к статье «Влияние метаболитов *Candida* spp. на фибробласты кожи человека» (авторы: Н.И. Игнатова, М.И. Заславская, Н.А. Александрова, О.Е. Орлова, В.Г. Мельников) (с. 381–385)

Illustrations for the article "Impact of *Candida* spp. metabolites on human skin fibroblasts" (authors: Ignatova N.I., Zaslavskaya M.I., Alexandrova N.A., Orlova O.E., Melnikov V.G.) (pp. 381–385)

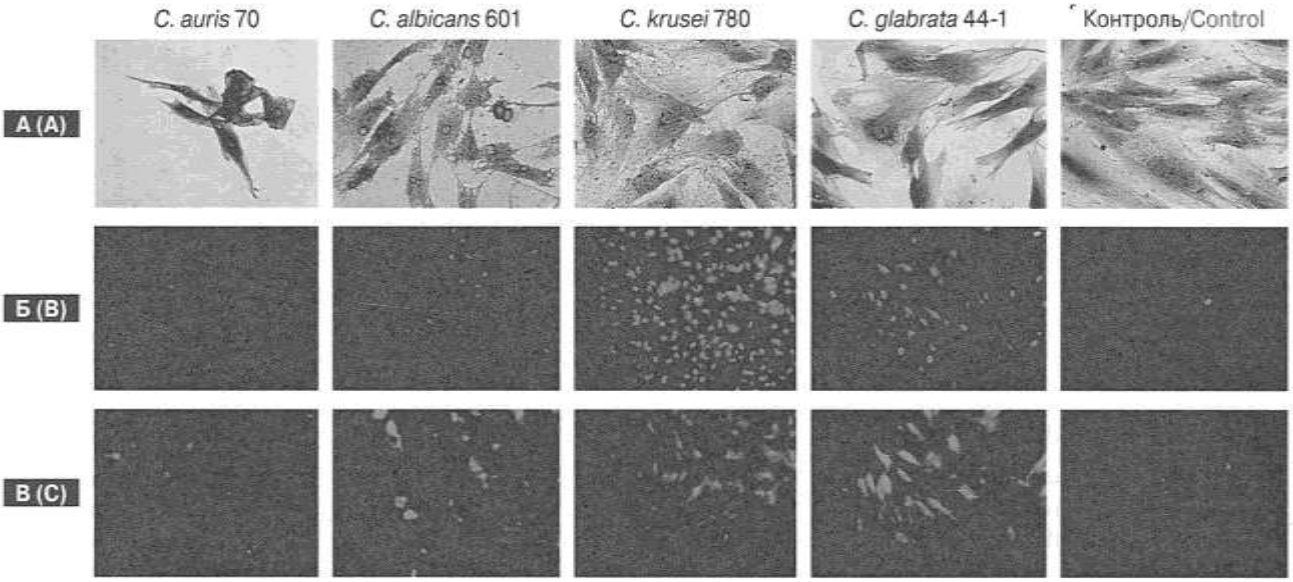

Рисунок. Результаты инкубации монослоя дермальных фибробластов человека с метаболитами кандид. Контроль — монослой фибробластов после инкубации в среде Сабуро

Figure. *Candida* metabolites affect human dermal fibroblast monolayer. Control — fibroblast monolayer incubated in Saburo medium

Примечания. А — морфология монослоя фибробластов после 24 часов воздействия метаболитов кандид (×400); Б — фибробласты монослоя в состоянии некроза/позднего апоптоза (флуоресценция зеленым светом) после 3 часов воздействия метаболитов кандид (×200); В — фибробласты монослоя в состоянии апоптоза (флуоресценция красным светом) после 3 часов воздействия метаболитов кандид (×200).

Notes. A — morphology of fibroblast monolayer 24 hours after exposure to *Candida* metabolites (×400); B — fibroblast monolayer in necrosis/late apoptosis (green fluorescence) 3 hours after exposure to *Candida* metabolites (×200); C — fibroblast monolayer in apoptosis (red fluorescence) 3 hours after exposure to *Candida* metabolites (×200).