

ISSN 1609-1175

Тихоокеанский Медицинский Журнал

PACIFIC MEDICAL JOURNAL

2018, № 4

РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Основан в 1997 году
Выходит один раз в три месяца



Издательство
МЕДИЦИНА ДВ

Главный редактор

В.Б. Шуматов

Заместители главного редактора:

Е.В. Елисеева

В.М. Черток

Редакционная коллегия:

А.В. Адрианов (Владивосток), Н.Н. Беседнова (Владивосток), Б.И. Гельцер (Владивосток), А.В. Говорин (Чита), Ю.И. Гринштейн (Красноярск), В.И. Киселев (Барнаул), В.К. Козлов (Хабаровск), Р.С. Козлов (Смоленск), В.П. Колосов (Благовещенск), В.Р. Кучма (Москва), И.О. Маринкин (Новосибирск), В.А. Невзорова (Владивосток), Т.М. Обухова (Омск), Ю.И. Пиголкин (Москва), К.В. Стегний (Владивосток), В.А. Стоник (Владивосток), Л.В. Транковская (Владивосток), И.Е. Чазова (Москва), Б.А. Черняк (Иркутск), Т.А. Шуматова (Владивосток)

Редакционный совет:

А.С. Белевский (Москва), А.Д. Ботвинкин (Иркутск), П.Г. Горовой (Владивосток), И.М. Давидович (Хабаровск), В.А. Кожевников (Барнаул), В.Н. Лучанинова (С.-Петербург), В.Ю. Мареев (Москва), Е.В. Маркелова (Владивосток), Ю.М. Перельман (Благовещенск), А.В. Полевщиков (С.-Петербург), Б.Я. Рыжавский (Хабаровск), Л.М. Сомова (Владивосток), Ю.С. Хотимченко (Владивосток), Г.А. Чумакова (Барнаул)

Иностранные члены редакционного совета:

Atsushi Nakamura (Japan, Hiroshima), Jin Liang Hong (China, Beijing), Moon oh Riin (Republic of Korea, Seoul), Rzhetsky A. Yu. (USA, Chicago), Sorokin V.A. (Singapore, Singapore), Torchilin V.P. (USA, Boston), Yamamoto Masahary (Japan, Niigata), Yong Zhang (China, Harbin), Zhang Feng-Min (China, Harbin), Zhao Baochang (China, Xi'an)

Ответственный секретарь М.В. Бектасова

Научный редактор О.Г. Полушин

Ответственный редактор номера **Е.В. Маркелова**

Тихоокеанский медицинский журнал, 2018, № 4 (74)

Октябрь–декабрь 2018 г.

Решением президиума ВАК Минобрнауки России включен в перечень ведущих рецензируемых научных журналов, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней кандидата и доктора наук. Входит в систему Российского индекса научного цитирования (РИНЦ) на базе научной электронной библиотеки eLIBRARY.RU

Учредители:

Краевой клинический центр специализированных видов медицинской помощи (690091, г. Владивосток, ул. Уборевича, 30/37), Тихоокеанский государственный медицинский университет (690002, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2), НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова (690087, г. Владивосток, ул. Сельская, 1), Департамент здравоохранения Приморского края (690007, Владивосток, 1-я Морская ул., 2)

Редакция

«Тихоокеанского медицинского журнала»:

690002, г. Владивосток, пр-т Острякова, 4
Тел./факс: +7 (423) 245-56-49

Журнал зарегистрирован Министерством РФ по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций ПИ № 77-13584 от 20.09.2002 г.

Издатель Тихоокеанский государственный медицинский университет
690002, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2
Тел./факс: +7 (423) 242-97-78

Главный редактор В.Б. Шуматов
Зав. редакцией Е.П. Каргалова
Редактор И.М. Забавникова
Технический редактор Т.В. Петерсон
Корректор И.М. Луговая

Подписано в печать 05.11.2018 г.
Отпечатано 17.11.2018 г.
Печать офсетная. Формат 60×90/8
Усл. печ. л. 13. Заказ № 400.
Тираж 1000 экз.

Отпечатано в типографии «Рея»
690062, Владивосток, ул. Днепровская,
426, тел.: +7 (423) 230-23-06

Цена свободная

Выпуски «Тихоокеанского медицинского журнала» доступны на сайтах <http://tmj-vgmu.ru>, <http://elibrary.ru> и <http://vgmu.ru>
Правила оформления статей и сведения об авторах публикаций находятся на сайтах <http://tmj-vgmu.ru>, <http://vgmu.ru>

Обзоры

Маркелова Е.В., Кныш С.В., Неужкина Т.А., Байбарина Е.В.
Альфа-герпесвирусы: современный взгляд на структуру 5

Оригинальные исследования

Леонова Г.Н., Лубова В.А., Иванис В.А.
Мониторинг возбудителей клещевых инфекций
на территории Приморского края в 2014–2018 гг. 10

Шмагель К.В., Королевская Л.Б., Сайдакова Е.В., Шмагель Н.Г.
Углубление дефицита наивных Т-клеток CD4⁺
у пациентов с ВИЧ-инфекцией при коинфицировании
вирусом гепатита С 15

Довжикова И.В., Андриевская И.А., Петрова К.К.,
Луценко М.Т.
Прогестерон и его 5β-метаболит –
маркеры угрожающего течения беременности
при цитомегаловирусной инфекции 20

Раков А.В., Кузнецова Н.А., Соловьева А.С., Яковлев А.А.
Кластерный анализ популяций *Salmonella* Enteritidis,
выделенных в различных регионах Сибири и Дальнего
Востока 23

Мелконян Г.Г., Коваль А.Н., Ташикинов Н.В.,
Стрельникова Н.В., Васильева Е.Э.
Микробиологический статус искусственных гнойно-
воспалительных заболеваний мягких тканей,
ассоциированных с введением ротовой жидкости 27

Островская О.В., Кожарская О.В., Супрун С.В., Мусатов Д.В.,
Обухова В.Г., Ивахнишина Н.М., Наговицына Е.Б.,
Власова М.А., Лебедько О.А.
Морфометрическая характеристика терминальных
ворсин при инфицировании плаценты возбудителями
внутриутробных инфекций 29

Кныш С.В., Малков В.А., Просекова Е.В., Ковальчук В.К.
Особенности интерферонового статуса у пациентов
с опоясывающим герпесом 34

Просекова Е.В., Турянская А.И., Сабыныч В.А.
Оценка системы интерлейкина-17 у детей
с аллергической бронхиальной астмой 37

Королевская Л.Б., Сайдакова Е.В., Шмагель К.В., Шмагель Н.Г.
Иммунные комплексы и их роль в активации иммунитета
при ВИЧ-инфекции 41

Грачев Н.И., Красников В.Е., Турмова Е.П., Маркелова Е.В.,
Рублев В.Ю., Назаренко С.А.
Анализ показателей матриксной металлопротеиназы-9,
тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ 1-го
типа и их комплекса у пациентов с острым инфарктом
миокарда, подвергшихся чрескожным коронарным
вмешательствам 45

Запорожец Т.С., Гажа А.К., Звягинцева Т.Н.,
Маляренко О.С., Беседнова Н.Н.
Клеточные и молекулярные механизмы
иммуномодулирующего действия фукоидана из бурой
водоросли *Fucus evanesceus* 49

Ляун И.Н., Дробот Е.И., Сомова Л.М., Псарёва Е.В.,
Тимченко Н.Ф.
Влияние токсинов *Yersinia pseudotuberculosis*
на реактивность клеток врожденного иммунитета 53

Неужкина Т.А., Тулупова М.С., Матюшкина Л.С.,
Потапенко А.А.
Изменение уровня провоспалительных цитокинов
у женщин с заболеваниями шейки матки,
ассоциированными с папилломовирусной инфекцией 57

Голицына А.А., Югай Ю.В., Первов Ю.Ю., Климкина Т.Н.,
Ковальчук В.К.
Состояние мукозального иммунитета у пациентов
с пародонтитом 60

Михайлов А.О., Попов А.Ф., Иванис В.А., Хамуева Е.В.,
Иванова Н.С., Симакова А.И.
Оксидативное и нитрозативное повреждение ДНК
в патогенезе фиброза печени при хронических вирусных
гепатитах 63

Стрельникова Н.В., Антонова А.А., Туркутюков В.Б.,
Шаповаленко Е.С.
Эпидемиология неспецифических пародонтитов,
вызванных бактериями рода *Leptotrichia*, при хроническом
и рецидивирующем течении инфекции 71

Макаренкова И.Д., Ермакова С.П., Ахматова Н.К.,
Имбс Т.И., Семенова И.Б., Хотимченко М.Ю.,
Беседнова Н.Н., Макаренков М.А., Звягинцева Т.Н.
Фукоидан из бурой водоросли *Fucus evanesceus*:
иммунофенотипические и морфологические
изменения дендритных клеток – эффекторов врожденного
иммунитета 75

Организация здравоохранения

Суровенко Т.Н., Присеко Л.Г.
Применение препаратов интерферона и его индукторов
в амбулаторной педиатрической практике 79

Тармаева И.Ю., Одонцэцэг Браун, Панков В.А.,
Кулешова М.В.
Гигиеническая оценка условий труда работников
обогащательной фабрики горнообогащательного
комбината «Эрдэнэт» (Монголия) 84

Колесник Д.С., Гончаров А.Е., Колоджиева В.В.,
Нилова Л.Ю., Нечаев В.В., Оришак Е.А.
Серологический мониторинг при оценке эффективности
вакцинопрофилактики пневмококковой инфекции у детей
в организованных коллективах 89

Голубкова А.А., Платонова Т.А., Харитонов А.Н.,
Смирнова С.С., Ковязина С.А.
Вакцинопрофилактика кори и пути ее оптимизации
на завершающем этапе элиминации инфекции 91

Пасечник О.А., Зимогляд А.А., Ярусова И.В.,
Витрив С.В., Блох А.И.
Туберкулез с множественной и широкой лекарственной
устойчивостью в Омской области: основные тенденции
и характеристики 95

Reviews

Markelova E.V., Knysh S.V., Nevezhkina T.A.,
Baibarina E.V.
Alphaherpesviruses: the modern look at the viral structure 5

Original researches

Leonova G.N., Lubova V.A., Ivanis V.A.
Monitoring causative agents of tick-borne infections
in Primorsky Krai (2014–2018)..... 10

Shmagel K.V., Korolevskaya L.B., Saydakova E.V., Shmagel N.G.
Deficit deepening of naive T-cells CD4⁺ in patients
with HIV infection when co-infected with hepatitis C virus 15

Dovzhikova I.V., Andrievskaya I.A., Petrova K.K.,
Lutsenko M.T.
Progesterone and its 5 β -metabolite are markers of the
threatening course of pregnancy in cytomegalovirus infection.... 20

Rakov A.V., Kuznetsova N.A., Solovyeva A.S., Yakovlev A.A.
Cluster analysis of *Salmonella* Enteritidis populations
isolated in various regions of Siberia and the Far East..... 23

Melkonyan G.G., Koval A.N., Tashkinov N.V.,
Strelnikova N.V., Vasilyeva E.E.
Microbiological status of artificial pyoinflammatory diseases
of soft tissues associated with introduction of oral fluid..... 27

Ostrovskaya O.V., Kozharskaya O.V., Suprun S.V., Musatov D.V.,
Obuhova V.G., Ivakhnishina N.M., Nagovitsina E.B., Vlasova M.A.,
Lebed'ko O.A.
Morphometric characteristics of acroteric villi in case
of placenta infection by pathogens of intrauterine infections..... 29

Knysh S.V., Malkov V.A., Prosekova E.V., Kovalchuk V.K.
Features of interferon system in patients with herpes zoster 34

Prosekova E.V., Turyanskaya A.I., Sabynych V.A.
Assessment of interleukin-17 system in children
with allergic bronchial asthma 37

Korolevskaya L.B., Saydakova E.V., Shmagel K.V., Shmagel N.G.
Immune complexes and their role in activation
of immunity in HIV-infection.....41

Grachev N.I., Krasnikov V.E., Turmova E.P., Markelova E.V.,
Rublev V.Yu., Nazarenko S.A.
Analysis of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), tissue inhibitor
of metalloproteinases type 1 (TIMP-1) and MMP-9/TIMP-1
complex in patients with acute myocardial infarction after
percutaneous coronary interventions..... 45

Zaporozhets T.S., Gazha A.K., Zvyagintseva T.N.,
Malyarenko O.S., Besednova N.N.
Cellular and molecular mechanisms of immunomodulatory
action of fucoidan from brown alga *Fucus evanescens* 49

Lyapun I.N., Drobot E.I., Somova L.M., Psareva E.K.,
Timchenko N.F.
Effect of *Yersinia pseudotuberculosis* toxins
on the reactivity of innate immunity cells 53

Nevezhkina T.A., Tulupova M.S.,
Matyushkina L.S., Potapenko A.A.
Changes in the level of pro-inflammatory cytokines
in women with diseases of the cervix uterus associated
human papillomavirus infection..... 57

Golitsyna A.A., Yugay Yu.V., Pervov Yu.Yu., Klimkina T.N.,
Kovalchuk V.K.
The state of mucosal immunity in patients with periodontitis..... 60

Mikhaylov A.O., Popov A.F., Ivanis V.A., Khamueva E.V.,
Ivanova N.S., Simakova A.I.
Oxidative and nitrosative DNA damage in hepatic fibrosis
pathogenesis in chronic viral hepatitis..... 63

Strelnikova N.V., Antonova A.A., Turkutyukov V.B.,
Shapovalenko E.S.
Epidemiology of nonspecific periodontitis caused by bacteria
Leptotrichia, chronic and recurrent course of infection.....71

Makarenkova I.D., Ermakova S.P., Akhmatova N.K., Imbs T.I.,
Semenova I.B., Khotimchenko M.Yu., Besednova N.N.,
Makarenkov M.A., Zvyagintseva T.N.
Fucoidan from the tang *Fucus evanescens*: immunophenotypic
and morphological changes of dendritic cells – effectors
of innate immunity 75

Public Health Organization

Surovenko T.N., Priseko L.G.
The use of interferon and its inductors
in outpatient pediatric practice 79

Tarmaeva I.Yu., Odontsetseg Braun, Pankov V.A., Kuleshova M.V.
Sanitary audit of working conditions in the concentrating mill
of ore mining and processing enterprise Erdenet (Mongolia) 84

Kolesnik D.S., Goncharov A.E., Kolodzhieva V.V., Nilova L.Yu.,
Netchaev V.V., Orishak E.A.
Serological monitoring by evaluation of the effectiveness
of vaccine prophylaxis of pneumococcal infection in organized
groups of children 89

Golubkova A.A., Platonova T.A., Kharitonov A.N.,
Smirnova S.S., Kovyazina S.A.
Vaccine prophylaxis of measles and ways of its optimization
at the final stage of infection elimination.....91

Pasechnik O.A., Zimoglyad A.A., Yarusova I.V.,
Vitriv S.V., Blokh A.I.
Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis
in the Omsk region: trends and characteristics..... 95

УДК 616.523:575

DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2018.4.5-9

Альфа-герпесвирусы: современный взгляд на структуру

Е.В. Маркелова¹, С.В. Кныш¹, Т.А. Невежкина¹, Е.В. Байбарина²¹ Тихоокеанский государственный медицинский университет (690002, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2),² Профессорская клиника Юцковских (690001, г. Владивосток, ул. Металлистов, 3)

Обзор публикаций, посвященных альфа-герпесвирусам, их таксономии, морфологии и жизненному циклу. Среди альфа-герпесвирусов выделяют три вида, способных вызывать антропонозные инфекции: вирус простого герпеса 1-го и 2-го типов и вирус ветряной оспы. Несмотря на общность структуры, заболевания, вызываемые этими вирусами, отличаются как патогенезом, так и клиническими проявлениями. Из-за сложностей моделирования ветряной оспы изучение более доступных для моделирования вирусов простого герпеса становится важной задачей для научного общества.

Ключевые слова: герпетическая инфекция, вирусы простого герпеса, вирус ветряной оспы, геномная организация

Герпетическая инфекция – неотъемлемый спутник человека на протяжении продолжительного времени. Симптомы, характерные для этой инфекции, описаны еще в античных трудах по медицине, в том числе и Гиппократом, давшем заболеванию имя, родственное древнегреческому слову «герпейн», означающему «ползать». Заболевание, проявляющееся сильной сыпью и зудом, долгое время считалось оспой, иногда приводящей к летальному исходу, иногда – нет. И лишь О. Фогель в 1772 г. доказал различную природу натуральной и ветряной оспы, выделив *Varicella*, как отдельное заболевание, а к 1911 г. бразильский исследователь и врач Э. Арагао обнаружил элементарные тельца (позднее названные в его честь) в содержимом сыпи, таким образом подтвердив вирусную природу заболевания. Годом позже немецкие ученые А. Левенштейн и В. Грютер доказали вирусную природу лабиального герпеса. Однако подробное изучение герпетической инфекции стало возможным лишь ко второй половине XX века, когда был изобретен электронный микроскоп, позволивший подтвердить факт пожизненного инфицирования вирусом герпеса, высказанный ранее в 1923 г. К. Левадити и Ш. Николау [4].

К семейству герпесвирусов морфологи причисляют более 100 различных видов, однако патогенными для человека большинство ученых считает девять из них, способных вызывать антропонозные заболевания [16, 32]. К болезнетворным относят вирус простого герпеса 1-го типа (*Herpes Simplex Virus 1* – HSV-1), вирус простого герпеса 2-го типа (*Herpes Simplex Virus 2* – HSV-2), вирус ветряной оспы, вирус Эпштейна–Барра, цитомегаловирус, герпесвирус 6-го типа А и 6-го типа В, герпесвирус 7-го типа и герпесвирус, ассоциированный с саркомой Капоши.

Несмотря на общность структуры вирусной частицы, заболевания, вызываемые герпесвирусами, отличаются по патогенезу, клиническим проявлениям и последствиям, что привело к необходимости дальнейшего разделения семейства *Herpesviridae*, объединившего

названные вирусы, на подсемейства, выделяемые на основе структурных и функциональных особенностей возбудителя, характера репликации, тропизма и длительности репродуктивного цикла [7]. Начало данной классификации было положено в семидесятых годах XX века, и в настоящее время выделяют три основных подсемейства герпесвирусов, объединяющих большинство представителей семейства и генетически разделившихся еще 200 млн лет назад: альфа-герпесвирусы (вирусы простого герпеса 1-го и 2-го типов, вирус ветряной оспы и вирус чумы собак), бета-герпесвирусы (цитомегаловирус, герпесвирусы 6-го типа А и В и герпесвирус 7-го типа) и гамма-герпесвирусы (вирус Эпштейна–Барра и герпесвирус, ассоциированный с саркомой Капоши) [38].

Короткий репродуктивный цикл, быстрое развитие цитопатического эффекта, способность к репликации в различных тканях организма-хозяина и дальнейшей пожизненной персистенции, латенции и реактивации, в случае уменьшения противовирусной резистентности организма – общие черты представителей наиболее распространенного и эпидемиологически значимого подсемейства альфа-герпесвирусов. Важную роль играет их взаимодействие с иными хроническими заболеваниями, не только вирусного генеза. Показано, что проявления герпесвирусной инфекции повышают риск инфицирования вирусом иммунодефицита человека и могут стать первыми признаками приобретенного иммунодефицита [39, 47].

Важной особенностью, отличающей вирусы простого герпеса обоих типов от вируса ветряной оспы, можно назвать Т-клеточный тропизм последнего. Вероятно, эта особенность связана с аэрогенным путем инфицирования, не характерным для большинства герпесвирусов, но основным для этого представителя подсемейства. Эта особенность влияет на патогенез первичной инфекции и служит одной из причин крайне высокой вирулентности вируса ветряной оспы [11].

Благодаря персистенции в нервной ткани неоднозначно оценивается связь между герпесвирусами и деменцией. Опубликованы доказательства

Кныш Сергей Васильевич – аспирант кафедры нормальной и патологической физиологии ТГМУ; e-mail: knysh.sergey@tafimed.ru

потенцирующей роли этих вирусов в развитии болезни Альцгеймера [1, 19, 29, 35]. Также существует гипотеза, что влияние герпесвирусов здесь напрямую связано с присутствием аполипопротеина-ε4, сопряженно с развитием болезни Альцгеймера [28]. Однако S. Agostini et al. [8] продемонстрировали результаты, свидетельствующие о защитной роли HSV-1-специфического иммунитета в ее развитии. В то же время K. Bourgade et al. [13] сделали заключение о защитном эффекте бета-амилоида, накапливающегося при болезни Альцгеймера и направленном против HSV-1-инфекции.

Неоднозначные мнения существуют и по вопросу онкогенности, обнаруженной у альфа-герпесвирусов, несмотря на то, что классически онкогенными считались гамма-герпесвирусы [10, 34, 50].

Морфология альфа-герпесвирусов во многом схожа. Ранние методы электронной микроскопии не позволяли выявить различия между их типами [6]. Вирион герпесвируса сложен и представлен нуклеоидом, содержащим генетическую информацию, белковым капсидом, обладающим строгой симметрией, аморфным тегументом и фосфолипидным бислоем, состоящим из частей мембраны клетки хозяина и вирусных белков [2]. Не найдено и однозначных данных о размерах вирионов. Для вируса простого герпеса 1-го типа в литературе приводятся достаточно вариативные данные. M.J. Tomishima et al. [48] считают, что полный диаметр вириона составляет 200 нм. A. Runthala et al. [43] описывают его размер в пределах 100–200 нм, а R.F. Laine et al. [33] полагают, что диаметр вириона составляет 150–240 нм. В прочих источниках размеры колеблются от 120 до 300 нм [14, 30]. Вирион вируса простого герпеса 2-го типа большинством авторов описывается совместно с вирионом вируса 1-го типа и не отличается от него по размерам. Для вируса ветряной оспы характерен меньший размер – от 80–120 до 170–200 нм [11, 51]. Длина геномов, соответствующая тенденции в размерах вирионов, также различается. Длина генома вируса простого герпеса 1-го типа равна 152 kbp, что, по данным S. Burrell et al. [17], соответствует длине генома вируса простого герпеса 2-го типа. Геном вируса ветряной оспы меньше и составляет, по мнению разных авторов, от 125 до 129 kbp [27, 31, 51].

Геномная организация альфа-герпесвирусов достаточно схожа. В ее основе лежит двухцепочечная линейная ДНК. В своем составе ДНК вирусов имеются по два уникальных сегмента, ограниченных повторяющимися участками различной длины. Уникальные сегменты обозначаются как короткий (Unique Short – US) и длинный (Unique Long – UL), повторяющиеся участки – внутренний (Internal Repeat – IR) и терминальный (Terminal Repeat – TR) [21].

Геномы вирусов простого герпеса 1-го и 2-го типов среди прочих герпесвирусов в наибольшей степени схожи. Их главное отличие заключается в уникальном коротком сегменте, который у вируса 1-го типа больше на 1349 bp, чем у вируса 2-го типа [21]. Короткий

уникальный сегмент вируса ветряной оспы в свою очередь гораздо меньше, чем соответствующий сегмент вируса простого герпеса 1-го типа – 5,2 kb против 13 kb. Повторяющиеся участки здесь также меньше. В то же время сильно различается гуанин-цитозиновый состав: от 68–70 % у вирусов простого герпеса до 46 % у вируса ветряной оспы [27, 31].

Вирионы герпесвирусов 1-го и 2-го типов обладают сходством и возможностью изомеризации генома. Они образуют четыре эквимольных изомера за счет различного пространственного расположения коротких и длинных уникальных сегментов [31]. Вирус ветряной оспы в свою очередь также способен формировать четыре изомера, однако частота инверсии его уникальных длинных сегментов крайне мала (до 5 %), и ранее возобладало мнение о возможном образовании им лишь двух изомеров [22, 27].

Генетическое постоянство внутри подсемейства альфа-герпесвирусов также различается. Вирусы простого герпеса обладают гораздо большей вариативностью генома, чем вирус ветряной оспы, во многом за счет наличия большего количества мутаций, большего числа циклов репликации, что выражается в различии генома даже в рамках одного штамма [46]. В случае ветряной оспы в настоящее время выделяют семь различных кладов, ключевыми отличиями которых считаются их первоначальная географическая разобщенность и наличие однонуклеотидных полиморфизмов – результата точечных мутаций, ведущих к изменению аминокислотных последовательностей. Однако геном вируса ветряной оспы достаточно стабилен и отличается внутри кладов лишь на 0,1 %, а между кладами – на 0,2 %, что во многом обусловлено коротким репликационным циклом при первичной инфекции и относительно медленной рециркуляцией [15, 46, 51].

В геномах всех герпесвирусов содержится 41 обязательный ген, представленный во всех трех подсемействах. Многие из этих генов необходимы для репликации вириона и имеют свои гомологи внутри подсемейств. К ним относят гены, кодирующие протеин IE4, ДНК-полимеразу, компоненты хеликазы и праймазы, белок, связывающий одноцепочечную ДНК, рибонуклеотидредуктаза, урацил-ДНК-гликозилаза, дезоксиуридин-5"-трифосфат-нуклеотидгидролаза (дУТФаза), ДНКаза, ORF47-протеинкиназа, главный протеин капсида, протеаза, ряд белков тегумента и гликопротеины gB, gH, gL, gM, gN.

В геноме вируса простого герпеса 1-го типа выделяют 85 генов, кодирующих протеины, 11 из которых были обнаружены экспериментально, и 7 генов, которые представляют некодирующие РНК. Ряд транскриптов не кодирует белки, из них наиболее изучены транскрипты, связанные с латентностью вируса и закодированные в участке OriS регуляторные микроРНК [32]. Семь генов кодируют белки, необходимые для репликации ДНК: *UL9*, *ICP8*, *UL30/42*, *UL5/UL8/UL52*. В геноме находятся три точки начала репликации: OriS, продублированный дважды в повторяющемся

участке, и OriL, расположенный в уникальном длинном сегменте. Белки тегумента выполняют структурную и регуляторную функции во время репликации и распространения вируса. Белки непосредственно взаимодействуют и образуют функциональный комплекс, который имеет важное значение для модуляции морфологии клетки хозяина [9].

Геном вируса ветряной оспы состоит из 70 генов, включая считые *ORF42/45*, *ORF62/70*, *ORF63/69* и *ORF64/68*. Позже был расшифрован практически весь протеом этого вируса, были описаны гены *ORF0*, *ORF9A*, *ORF33.5* [20], однако данные исследований свидетельствуют и о наличии иных, неописанных генов. Вирус ветряной оспы имеет гены, отсутствующие в геноме вируса простого герпеса 1-го типа: *ORF1*, *2*, *13*, *32*, *57* и *S/L*. В свою очередь вирус простого герпеса кодируют девять генов – *UL45*, *UL56*, *US2*, *US5*, *US6*, *US11*, *US12* и *LAT*, которых нет у вируса ветряной оспы. Еще одной отличительной особенностью генома вируса ветряной оспы можно назвать отсутствие характерной для остальных альфа-герпесвирусов латент-ассоциированной транскриптазы [44].

Для регуляции генов огромное значение имеет некодирующая РНК, также известная как микроРНК – мРНК. Эта РНК – часть группы некодирующих РНК, длиной примерно по 22 нуклеотида каждая. МикроРибонуклеиновые кислоты ответственны за регуляцию экспрессии более чем 60 % генов человека. мРНК вирусов простого герпеса изучена недостаточно, но существуют данные, свидетельствующие об их значимости в процессе установления латентной инфекции. мРНК присутствует также в бета- и гамма-герпесвирусах. До недавнего времени мРНК, теоретически предполагаемые для ветряной оспы, выявлены не были [24], однако в работе А. Marcus et al. в 2017 г. впервые описаны мРНК этого вируса [36]. мРНК играет важную роль в регуляции пути развития инфекции: будет ли повреждение клетки продуктивным или латентным [12].

Известно о роли мРНК вирусов простого герпеса в процессах «уклонения» от иммунной защиты и в прогрессировании латентной инфекции. Ранее сообщалось лишь о 17 мРНК у этих представителей подсемейства. В 2016 г. D. Piedade и J.M. Azevedo-Pereira [40] указали на наличие уже 27 мРНК у вируса 1-го типа и 24 мРНК у вируса 2-го типа. Позже были описаны miR-H28 и miR-29 – новые мРНК, экспрессируемые в поздний период инфекции [25]. Роль большинства из этих аминокислот в настоящее время изучена мало. Известно, что часть мРНК вируса 1-го типа, такие как miR-H1, -H2, -H3, -H4, -H5, -H6, -H7, вырабатываются в стадию латенции инфекции, другие – miR-H27 – набирают силу во время репликации и пролиферации, а miR-H17, -H18, -H26, -H28 и -H29 появляются в период реактивации инфекции [40].

После слияния вирусной оболочки с плазматической мембраной клетки во время проникновения в нее герпесвирусов, большая часть тегумента возбудителя отсоединяется, в то время как белок

UL36 остается связанным с капсидом [41]. Однако взаимодействие и функционирование этих белков недостаточно изучены.

Капсид вирусов герпеса имеет типичную икосаэдральную симметрию, размер 125 нм и формируется из восьми протеинов [3]. Он состоит из нескольких основных белков: UL19 (VP5), капсомер-связывающий UL35 (VP26), UL18 (VP23), UL38 (VP19C), которые в настоящее время еще до конца не исследованы [32]. Каждый капсомер содержит копии белка, которых насчитывается около 955, с помощью этих белков капсомеры взаимодействуют друг с другом. Основу типичного капсида альфа-герпесвируса составляют пентоны, гексоны и триплекс. Всего присутствует 11 пентонов, 150 гексонов и расположенные между ними 320 экземпляров триплекса, состоящих из белков VP23 и VP19C. В основе пентона лежит пять, а гексона – шесть копий белка VP5. На одной из вершин капсида находится «портал», служащий для перемещения ДНК вириона. «Портал» имеет цилиндрическую форму и образован 12 копиями протеина UL6. А. Huet et al. [26] определили гетеродимер белков UL17, UL25, UL36, которым дали название «вершинно-специфичный компонент» (CVSC). Белок специфически связывается с триплексами, прилегающими к пентону [26]. VP24-протеаза – один из ключевых элементов капсида, ответственных за его формирование и созревание, также входит в его состав. D. Zhang et al. [52] продемонстрировали важность этого фермента для вирулентности, описав его способность ингибировать продукцию β-интерферона. С помощью трансмембранных вирусных белков происходит эндоцитоз и слияние мембран вирионов и клетки [45]. В результате этого капсид освобождается от белков внешней оболочки, а комплекс «ДНК-белок вируса» проникает в ядро [37]. Вирион ветряной оспы обладает гомологичными протеинами, выполняющими сходные функции. Так, его белок ORF23 служит аналогом VP26, белок ORF40 (основной белок капсида) – аналогом VP5. ORF33 в свою очередь – аналогом VP24-протеазы [18].

Тегумент альфа-герпесвирусов состоит из большого числа белковых молекул и составляет основной объем вириона. В составе тегумента вирусов простого герпеса выделяют от 23 до 26 протеинов, а также генные транскрипты и актиноподобные филаменты. Тегумент придает вириону ассиметричную форму, один из полюсов вириона содержит около 35 нм тегумента между наружной оболочкой и капсидом, другой полюс имеет лишь крайне незначительную его прослойку. Белки тегумента альфа-герпесвирусов ответственны за широкий спектр функций, за тканевой и клеточный тропизм, нейрональный транспорт и патогенез инфекции. В большинстве своем эти белки гомологичны, однако существуют и различия в их функциях и значимости. Белки, необходимые для существования вирулентного штамма вируса простого герпеса, не относятся к таковым у вируса ветряной оспы, и наоборот. Т-клеточный тропизм, не типичной

для инфекции, вызванной вирусами простого герпеса, характерен для вириона ветряной оспы. В этом процессе у последнего значимая роль принадлежит белкам ORF66, ORF47 – гомологам белков US3, UL13 вируса простого герпеса [49].

Наружная оболочка вирионов альфа-герпесвирусов представлена липидным бислоем, содержащим в себе множество копий 11 вирусных гликопротеинов: gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL и gM [42]. Они позволяют вирионам взаимодействовать с клетками организма хозяина различными путями. В большинстве своем гликопротеины внутри обозначенного подсемейства обладают сходством, что затрудняет дифференциальную диагностику герпетической инфекции. Однако исследования последнего десятилетия продемонстрировали отсутствие перекрестных реакций при определении гликопротеина gE вириона ветряной оспы, ответственного за нейротропизм и за передачу вирусных частиц от клетки к клетке. В отличие от других гликопротеинов, в частности gB, этот гликопротеин не имеет общих эпитопов с гликопротеинами вирионов простого герпеса [23].

Таким образом, объединенные свойствами нейротропности, латенции и персистенции альфа-герпесвирусы, хоть и обладают сходством морфологии, различаются во многих значимых деталях. Наличие Т-клеточного тропизма вириона ветряной оспы, его способности к реактивации в виде опоясывающего герпеса – заболевания, отличающегося от первичной инфекции, обусловлены во многом структурными особенностями возбудителя и требуют дальнейшего изучения данного вируса на морфофункциональном уровне. Из-за сложности моделирования ветряной оспы изучение более доступных к моделированию вирусов простого герпеса 1-го и 2-го типов становится важной задачей для научного общества [5].

Литература / References

- Астрелина Т. А., Яковлева М. В., Шахпазян Н. К. [и др.]. Значение определения герпесвирусов человека в мезенхимальных стволовых клетках костного мозга и плаценты для клинического применения // *Гены и клетки*. 2012. № 4. С. 68–72.
Astrelina T.A., Yakovleva M.V., Shahpazyan N.K. [et al.]. Significance of human herpesvirus detection in multipotent mesenchymal stromal stem cells for clinical practice. // *Genes & Cells*. 2012. No. 4. P. 68–72.
- Луценко М. Т., Гориков И.Н. Некоторые сведения о морфологии герпес-вирусов и их свойствах // *Бюл. физ. и пат. дых.* 2010. № 38. С. 74–77.
Lutsenko M.T., Gorikov I.N. Some data about herpes-viruses morphology and their properties // *Bulletin Physiology and Pathology of Respiration*. 2010. No. 38. P. 74–77.
- Персистирующие вирусные инфекции: этиология и иммуннопатогенез / Маркелова Е.В., Скляр Л.Ф., Просекова Е.В. [и др.]. Владивосток: Медицина ДВ, 2016. 160 с.
Persisting viral infection / Markelova E.V., Sklyar L.F., Prosekova E.V. [et al.]. Vladivostok: Medicina DV, 2016. 160 p.
- Сергиенко Е.Н. Современный взгляд на ветряную оспу у детей // *Медицинские новости*. 2016. № 2. С. 4–8.
Serhiyenko E.N. Modern view of chicken pox in children // *Meditsinskie novosti*. 2016. No. 2. P. 4–8.
- Скляр Л.Ф., Маркелова Е.В., Нагорная А.В., Сотниченко С.А. Особенности клиники и состояния врожденного иммунитета при сочетанных герпесвирусных менингоэнцефалитах у ВИЧ-инфицированных пациентов // *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2014. № 1. С. 82–85.
Sklyar L.F., Markelova E.V., Nagornaya A.V., Sotnichenko S.A. Clinical features and the natural immunity state of the HIV-infected patients having herpes meningoencephalitis // *Pacific Medical Journal*. 2014. No. 1. P. 82–85.
- Собчак Д.М., Волский Н.Е., Свинцова Т.А. [и др.]. Иммунная система человека и особенности патогенеза герпетической инфекции (обзор) // *Современные технологии в медицине*. 2014. № 3. С. 118–127.
Sobchak D.M., Volsky N.E., Svintsova T.A. [et al.]. Human immune system and pathogenesis characteristics of herpetic infection (review) // *Modern Technologies in Medicine*. 2014. No. 3. P. 118–127.
- Тотолян Г. Г., Сторозжаков Г. И., Федоров И. Г. [и др.]. Вирусы группы герпеса и поражения печени // *Лечебное дело*. 2009. № 2. С. 4–11.
Totolyan G.G., Storozhakov G.I., Fedorov I.G. [et al.]. Viruses Herpes group and liver defeat // *Journal of General Medicine*. 2009. No. 2. P. 4–11.
- Agostini S., Mancuso R., Bagilio F., Clerici M. A protective role for herpes simplex virus type-1-specific humoral immunity in Alzheimer's Disease // *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 2017. Vol. 15, No. 2. P. 89–91.
- Albecka A., Owen D.J., Ivanova L. [et al.]. Dual function of the pUL7-pUL51 tegument protein complex in herpes simplex virus 1 infection // *J. Virol.* 2017. Vol. 91, No. 2. P. e02196–16.
- Alibek K., Baiken Y., Kakpenova A. [et al.]. Implication of human herpesviruses in oncogenesis through immune evasion and suppression // *Infect. Agent Cancer*. 2014. Vol. 9. No. 3. doi: 10.1186/1750-9378-9-3.
- Arvin A.M., Moffat J.F., Sommer M. [et al.]. Varicella-zoster virus T cell tropism and the pathogenesis of skin infection. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2010. Vol. 342. P. 189–209.
- Barzilai A., Zivony-Elborn I., Sarid R. [et al.]. The herpes simplex virus type 1 vhs-UL41 gene secures viral replication by temporarily evading apoptotic cellular response to infection: Vhs-UL41 activity might require interactions with elements of cellular mRNA degradation machinery // *J. Virol.* 2006. Vol. 80, No. 1. P. 505–513.
- Bourgade K., Le Page A., Bocti C. [et al.]. Protective effect of amyloid- β peptides against herpes simplex virus-1 infection in a neuronal cell culture model // *J. Alzheimers Dis*. 2016. Vol. 50, No. 4. P. 1227–1241.
- Bowman B.R., Baker M.L., Rixon F.J. [et al.]. Structure of the herpesvirus major capsid protein // *EMBO J*. 2003. Vol. 22, No. 4. P. 757–765.
- Breuer J., Grose C., Norberg P. [et al.]. A proposal for a common nomenclature for viral clades that form the species varicella-zoster virus: Summary of VZV Nomenclature Meeting 2008, Barts and the London School of Medicine and Dentistry, 24–25 July 2008 // *J. Gen. Virol.* 2010. Vol. 91, No. 4. P. 821–828.
- Brown J.C., Newcomb W.W. Herpesvirus capsid assembly: Insights from structural analysis. // *Current Opinion in Virology*. 2011. Vol. 1, No. 2. P. 142–149.
- Burrell S., Ait-Arkoub Z., Voujon D. [et al.]. Molecular characterization of herpes simplex virus 2 strains by analysis of microsatellite polymorphism // *J. Clin. Microbiol.* 2013. Vol. 51, No. 11. P. 3616–3623.
- Chaudhuri V., Sommer M., Rajamani J. [et al.]. Functions of varicella-zoster virus ORF23 capsid protein in viral replication and the pathogenesis of skin infection // *J. Virol.* 2008. Vol. 82, No. 20. P. 10231–10246.
- Chiara G.D., Racaniello M., Mollinari C. [et al.]. Herpes simplex virus-type1 (HSV-1) impairs DNA repair in cortical neurons // *Front. Aging Neurosci.* 2016. Vol. 8. doi: 10.3389/fnagi.2016.00242.

20. Cohen J.I. The varicella-zoster virus genome // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2010. Vol. 342. P. 1–14.
21. Dolan A., Jamieson F.E., Cunningham C. [et al.]. The genome sequence of herpes simplex virus type 2 // *J. Virol.* 1998. Vol. 72, No. 3. P. 2010–2021.
22. Ecker J.R., Hyman R.W. Varicella zoster virus DNA exists as two isomers // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1982. Vol. 79, No. 1. P. 156–160.
23. Grahm A., Studahl M., Nilsson S. [et al.]. Varicella-zoster virus (VZV) glycoprotein E is a serological antigen for detection of intrathecal antibodies to VZV in central nervous system infections, without cross-reaction to herpes simplex virus 1 // *Clinical and Vaccine Immunology.* 2011. Vol. 8, No. 18. P. 1336–1342.
24. Grundhoff A., Sullivan C.S. Virus-encoded microRNAs // *Virology.* 2011. Vol. 411, No. 2. P. 325–343.
25. Han Z., Liu X., Chen X. [et al.]. miR-H28 and miR-H29 expressed late in productive infection are exported and restrict HSV-1 replication and spread in recipient cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. Vol. 113, No. 7. P. 894–901.
26. Huet A., Makhov A.M., Huffman J.B. [et al.]. Extensive subunit contacts underpin herpesvirus capsid stability and interior-to-exterior allosteric // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2016. Vol. 23, No. 6. P. 531–539.
27. Human herpesviruses: Biology, therapy, and immunoprophylaxis / Ed. by Arvin A., Campadelli-Flume G., Mocarski E. [et al.]. Cambridge: Cambridge University Press, 2007. 1431 p.
28. Itzhaki R.F. Herpes simplex virus type 1 and Alzheimer's disease: Possible mechanisms and signposts // *FASEB Journal.* 2017. Vol. 8, No. 31. P. 3216–3226.
29. Itzhaki R.F., Lathe R., Balin B.J. [et al.]. Microbes and Alzheimer's disease // *J. Alzheimers Dis.* 2016. Vol. 51, No. 4. P. 979–984.
30. Kharkwal H., Smith C.G., Wilson D.W. Herpes simplex virus capsid localization to ESCRT-VPS4 complexes in the presence and absence of the large tegument protein UL36p // *J. Virol.* 2016. Vol. 90, No. 16. P. 7257–7267.
31. Kingchington P.R., St Leger A.J., Guedon J.-M.G., Hendricks R.L. Herpes simplex virus and varicella zoster virus, the house guests who never leave // *Herpesviridae.* 2012. Vol. 3, No. 5. doi: 10.1186/2042-4280-3-5.
32. Kukhanova M.K., Korovina A.N., Kochetkov S.N. Human herpes simplex virus: Life cycle and development of inhibitors. // *Biochemistry (Moscow).* 2015. Vol. 79, No. 13. P. 1635–1652.
33. Laine R.F., Albecka A., van de Linde S. [et al.]. Structural analysis of herpes simplex virus by optical super-resolution imaging // *Nat. Commun.* 2015. Vol. 6. Article No. 5980. doi: 10.1038/ncomms6980.
34. Le Goaster J., Bouree P., El Sissy F.N. [et al.]. HSV-1/HSV-2 infection-related cancers in Bantu populations driving HIV-1 prevalence in Africa: Tracking the origin of AIDS at the onset of the 20th century. // *Case Rep. Oncol.* 2016. Vol. 9, No. 3. P. 815–825.
35. Licastro F., Porcellini E. Persistent infections, immune-senescence and Alzheimer's disease // *Oncoscience.* 2016. Vol. 3, No. 5–6. P. 135–142.
36. Marcus A., Golani L., Ojha N.K. [et al.]. Varicella-zoster virus expresses multiple small noncoding RNAs // *Journal of Virology.* 2017. Vol. 24, No. 91. P. 894–901.
37. Mingo R.M., Han J., Newcomb W.W., Brown J.C. Replication of herpes simplex virus: egress of progeny virus at specialized cell membrane sites // *J. Virol.* 2012. Vol. 86, No. 13. P. 7084–7097.
38. Mori I., Nishiyama Y. Herpes simplex and varicella-zoster virus: why do these human alphaherpesviruses behave so differently from one another? // *Rev. Med. Virol.* 2005. Vol. 15, No. 6. P. 393–406.
39. Munawwar A., Singh S. Human herpesviruses as copathogens of HIV infection, their role in HIV transmission, and disease progression // *J. Lab. Physicians.* 2016. Vol. 8, No. 1. P. 5–18.
40. Piedade D., Azevedo-Pereira J.M. The role of microRNAs in the pathogenesis of herpesvirus infection // *Viruses.* 2016. Vol. 8, No. 6. P. 1–32.
41. Radtke K., Kieneker D., Wolfstein A. [et al.]. Plus- and minus-end directed microtubule motors bind simultaneously to herpes simplex virus capsids using different inner tegument structures // *PLoS Pathog.* 2010. Vol. 6, No. 7. doi: 10.1371/journal.ppat.1000991.
42. Rekabdar E., Tunback P., Liljeqvist J.-A. [et al.]. Dichotomy of glycoprotein G gene in herpes simplex virus type 1 isolates // *J. Clin. Microbiol.* 2002. Vol. 40, No. 9. P. 3245–3251.
43. Runthala A., Singh A.K. Tegument based in-silico drug targeting of herpes simplex virus-1 // *Saratov Journal of Medical Scientific Research.* 2010. Vol. 2, No. 6. P. 353–357.
44. Sadzot-Delvaux C., Rentier B. The role of varicella zoster virus immediate-early proteins in latency and their potential use as components of vaccines // *Arch. Virol. Suppl.* 2001. No. 17. P. 81–89.
45. Scrima N., Lepault J., Boulard Y. [et al.]. Insights into herpesvirus tegument organization from structural analyses of the 970 central residues of HSV-1 UL36 protein // *J. Biol. Chem.* 2015. Vol. 290, No. 14. P. 8820–8833.
46. Szpara M.L., Gatherer D., Ochoa A. [et al.]. Evolution and diversity in human herpes simplex virus genomes // *J. Virol.* 2014. Vol. 88, No. 2. P. 1209–1227.
47. Thienkrua W., Todd C.S., Chonwattana W. [et al.]. Incidence of and temporal relationships between HIV, herpes simplex II virus, and syphilis among men who have sex with men in Bangkok, Thailand: An observational cohort // *BMC Infectious Diseases.* 2016. Vol. 16. P. 340–350.
48. Tomishima M. J., Smith G.A., Enquist L.W. Sorting and transport of alpha herpesviruses in axons // *Traffic.* 2011. Vol. 2, No. 7. P. 429–436.
49. Wang K., Goodman K.N., Li D.Y. [et al.]. A herpes simplex virus 2 (HSV-2) gD mutant impaired for neural tropism is superior to an HSV-2 gD subunit vaccine to protect animals from challenge with HSV-2 // *J. Virol.* 2016. Vol. 90, No. 1. P. 562–574.
50. Yun S.J., Jeong P., Kanq H.W. [et al.]. Increased expression of herpes virus-encoded hsv1-miR-H18 and hsv2-miR-H9-5p in cancer-containing prostate tissue compared to that in benign prostate hyperplasia tissue // *Int. Neurourol. J.* 2016. Vol. 20, No. 2. P. 122–130.
51. Zerbini L., Sen L., Oliver S.L., Arvim A.M. Molecular mechanisms of varicella zoster virus pathogenesis // *Nat. Rev. Microbiol.* 2014. Vol. 12, No. 3. P. 197–210.
52. Zhang D., Su C., Zheng C. Herpes simplex virus 1 serine protease VP24 blocks the DNA-sensing signal pathway by abrogating activation of interferon regulatory factor 3 // *J. Virol.* 2016. Vol. 90, No. 12. P. 5824–5829.

Поступила в редакцию 06.09.2018.

ALPHAHERPESVIRUSES: THE MODERN LOOK AT THE VIRAL STRUCTURE

E.V. Markelova¹, S.V. Knysh¹, T.A. Nevezhkina¹, E.V. Baibarina²

¹ Pacific State Medical University (2 Ostyakova Ave. Vladovostok

690002 Russian Federation), ² Yutskovsky's Professorial Clinic, Ltd

(3 Metallistov St. Vladivostok 690001 Russian Federation)

Summary. The review of publications on alphaherpesviruses, their taxonomy, morphology and life cycle is represented. Alphaherpesviruses are divided into three types that can cause anthroponous infections: herpes simplex virus types I and II, and varicella-zoster virus. Despite the common structure, diseases caused by these viruses differ in both pathogenesis and clinical manifestations. Because of complexity of varicella modeling the study of herpes simplex viruses more accessible for modeling is a significant need for scientific society.

Keywords: *herpetic infection, herpes simplex virus, varicella-zoster virus, genomic organization*

Pacific Medical Journal, 2018, No. 4, p. 5–9.

УДК 616.995.7:595.42(571.6)

DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2018.4.10-14

Мониторинг возбудителей клещевых инфекций на территории Приморского края в 2014–2018 гг.

Г.Н. Леонова¹, В.А. Лубова¹, В.А. Иванис²¹ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова (690087, г. Владивосток, ул. Сельская, 1),² Тихоокеанский государственный медицинский университет (690002, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Исследовали зараженность возбудителями трансмиссивных клещевых инфекций людей и иксодовых клещей в эпидемические сезоны 2014–2018 гг. на территориях природных очагов Приморского края. Оценка активности и распространенности возбудителей клещевых инфекций получена при анализе зараженности иксодовых клещей, собранных с растительности, присосавшихся клещей, снятых с людей, а также проб крови лиц спустя 2–3 дня после укуса клеща. С помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени было показано существование на юго-восточной территории Приморского края шести возбудителей «клещевых» инфекций: клещевого энцефалита, болезни Лайма, клещевой возвратной лихорадки, вызванной *Borrelia miyamotoi*, гранулоцитарного анаплазмоза, мононуклеарного эрлихиоза и клещевых риккетсиозов. Чаще всего в иксодовых клещах обнаруживались боррелии (*B. burgdorferi* s.l. и *B. miyamotoi*). Единичными были находки генетических маркеров вируса клещевого энцефалита, анаплазм и эрлихий. Кроме того, на этих территориях детектировали ДНК *Rickettsia heilongjiangensis*. Установлена взаимосвязь зараженности иксодовых клещей вышеуказанными возбудителями с показателями заболеваемости этими инфекциями жителей Приморского края.

Ключевые слова: возбудители клещевых инфекций, Приморский край

Прошло более 80 лет с открытия на Дальнем Востоке новой нейровирусной инфекции, возникающей после укуса клеща. Установлена причина этого заболевания – вирус клещевого энцефалита (КЭ), который был выделен в 1937 г. одновременно не только из иксодовых клещей, но и от больных и умерших людей [3]. Долгие годы это была единственная инфекция, передаваемая клещами, которая интенсивно изучалась на всей территории Евразийского континента. До настоящего времени считается, что КЭ – самая распространенная нейровирусная инфекция во многих странах Западной, Центральной, Восточной и отчасти Северной Европы, в большинстве регионов России, в северных провинциях Китая, Монголии и в Японии на острове Хоккайдо [1, 7, 15]. Установлено, что вирус КЭ относится к роду *Flavivirus* семейства *Flaviviridae* и служит основным представителем серологической группы вирусов комплекса КЭ. По международной классификации флавивирусов, принятой в 2000 г., вирус КЭ был подразделен на три субтипа: дальневосточный, сибирский и европейский [11]. Общеизвестно, что КЭ на Дальнем Востоке протекает тяжелее, чем на других евразийских территориях [1]. Такое проявление инфекции ряд исследователей связывают с циркуляцией здесь штаммов дальневосточного субтипа [1, 5]. По мере накопления данных и приобретения новых знаний стало ясно, что под маской КЭ скрываются случаи заболеваний не только вирусной (Повассан, Louping-ill) [5, 12, 13], но и бактериальной этиологии, объединенные в группу инфекций, передающихся клещами [2]. Только за последние пять лет в медицинские учреждения Российской Федерации

по поводу укусов клещей обратилось более 2,3 млн человек, что в среднем составило 468,8 тыс. случаев в год. На территории России наиболее широко распространены иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ) и КЭ [2].

В последние годы также появились данные о выявлении в иксодовых клещах других возбудителей бактериальной природы. Так, описано «новое» инфекционное заболевание в числе иксодового клещевого боррелиоза, вызываемого *Borrelia miyamotoi* [14]. Ранее оно рассматривалось как разновидность болезни Лайма и официально регистрировалось как «безэритемная форма ИКБ». В странах умеренного климата Северного полушария ДНК *B. miyamotoi* обнаруживается полимеразной цепной реакцией в клещах рода *Ixodes*. Секвенирование небольшого числа генов и межгенных спейсеров позволило четко выделить три генетические линии *B. miyamotoi*: «азиатскую» (переносчик – *I. persulcatus*), «американскую» (переносчики – *I. scapularis* и *I. pacificus*) и «европейскую» (переносчик – *I. ricinus*). С 1995 до 2016 г. из числа известных 5–6 штаммов *B. miyamotoi* проведено секвенирование трех полноразмерных хромосомных геномов – *CT14D4* и *LB-2001* (США) и *FR64b* (Япония). В Российской Федерации из крови больных ИКБ Ижевска и Екатеринбурга в 2016 г. выделено шесть изолятов *B. miyamotoi*. С помощью мультилокусного секвенирования-типирования боррелий по восьми генам показано, что геномы российских изолятов, хотя и имели ряд изолят-специфических нуклеотидных и аминокислотных вариаций, характеризовались невысокой степенью полиморфизма и филогенетически были близки, что свидетельствовало в пользу гипотезы о клональности популяции *B. miyamotoi* на территории нашей страны [4].

Таблица 1

Детекция РНК/ДНК возбудителей клещевых инфекций в клещах, собранных с растительности на юго-восточных территориях Приморского края

Вид клеща	Кол-во клещей, абс.	Кол-во возбудителей, %						
		Вирус КЭ	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	<i>B. miyamotoi</i>	<i>A. phagocytophilum</i>	<i>E. chaffeensis</i> / <i>E. muris</i> -FL	Rickettsia spp	
о. Русский								
<i>I. persulcatus</i>	174	0	31	4	3,4	4	н.о.	
<i>Haemaphysalis</i>	44	0	0	2,2	0	4,5	н.о.	
<i>D. silvarum</i>	20	0	5	0	0	5	н.о.	
<i>I. pavlovskiyi</i>	2	0	0	0	0	0	н.о.	
Итого:	240	0	23,3	3,3	2,5	4,1	н.о.	
Шкотовский район								
<i>I. persulcatus</i>	92	0	65	2,5	2,5	7,5	н.о.	
<i>Haemaphysalis</i>	6	0	0	0	0	0	н.о.	
Итого:	98	0	40,6	1,6	1,6	4,7	н.о.	
Ольгинский район								
<i>I. persulcatus</i>	15	0	42,9	0	14,3	0	н.о.	
<i>Haemaphysalis</i>	3	0	0	0	0	0	н.о.	
<i>D. silvarum</i>	2	0	0	0	0	0	н.о.	
Итого:	20	0	30	0	10	0	н.о.	
Хасанский район								
Юго-запад	<i>I. persulcatus</i>	33	0	68,8	0	25	6,3	0
	<i>Haemaphysalis</i>	167	2,1	0	0	0	0	12,5
	Итого:	200	1,6	17,2	0	6,3	1,6	9,4
Восток	<i>I. persulcatus</i>	61	0	18	1,6	3,3	3,3	0
	<i>Haemaphysalis</i>	126	1,9	0	0	1,9	0	15,7
	Итого:	187	0,9	9,8	0,9	2,7	1,8	7,1

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3: н.о. – не определяли.

Гранулоцитарный анаплазмоз человека и моноцитарный эрлихиоз человека – также распространенные в России инфекции, передаваемые иксодовыми клещами. Их очаги локализованы преимущественно на лесных территориях Российской Федерации и сопредельных государств (Казахстан, Монголия, Китай) и связаны с клещами рода *Ixodes*. С 2013 г. в России была введена официальная регистрация гранулоцитарного анаплазмоза моноцитарного эрлихиоза человека. По данным Н.В. Рудакова [8], за три года в стране учтено 542 случая гранулоцитарного анаплазмоза и 94 случая моноцитарного эрлихиоза, показатели заболеваемости на 100 тыс. населения составили 0,08–0,18 и 0,01–0,04, соответственно. Причем эти заболевания чаще выявляли у пациентов с микст-инфекциями (обычно в сочетании с клещевым энцефалитом или клещевыми боррелиозами) [10].

Цель данного исследования состояла в оценке зараженности возбудителями трансмиссивных клещевых инфекций людей и иксодовых клещей в эпидемические сезоны 2014–2018 гг. на территориях природных очагов Приморского края.

Материал и методы

В эпидемические сезоны 2014–2017 гг. на юго-восточных территориях Приморского края, включая о. Русский, Хасанский, Шкотовский и Ольгинский районы, были собраны с растительности 742 иксодовых клеща (табл. 1). Также исследованы 975 иксодовых клещей, снятых с людей, пострадавших от их укусов, в 2014–2018 гг. на территориях, прилежащих к г. Владивостоку, в том числе на о. Русском и в Надеждинском районе (табл. 2). Кроме того, в этот период исследовано 349 проб крови лиц после присасывания иксодовых клещей на этих же территориях (табл. 3).

Материал проверяли на наличие ДНК/РНК вируса клещевого энцефалита, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia muris* / *Ehrlichia chaffeensis* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием набора «Ампли-Сенс ТБЕВ, *B. burgdorferi* s.l., *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis* / *E. muris*-FL» (ЦНИИ эпидемиологии, г. Москва) согласно инструкции производителя на амплификаторе с флуоресцентной детекцией ROTOR-GENE Q

Таблица 2

Детекция РНК/ДНК возбудителей клещевых инфекций в присосавшихся клещах, снятых с людей на территориях, прилежащих к г. Владивостоку, в 2014–2018 гг.

Административные районы*	Кол-во клещей, абс.	Кол-во возбудителей, %						
		Вирус КЭ	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	<i>B. miyamotoi</i>	<i>A. phagocytophilum</i>	<i>E. chaffeensis</i> / <i>E. muris</i> -FL	Rickettsia spp	
2014 г.	ВГО и НР	23	0	34,8	5	4,3	4,3	н.о.
	о. Русский	46	2,2	21,7	15,2	0	4,1	н.о.
2015 г.	ВГО и НР	136	1,4	39,7	13,3	0	1,4	н.о.
	о. Русский	48	8,3	37,5	14,8	10,4	2	н.о.
2017 г.	ВГО и НР	243	0,4	24,3	н.о.	0,4	0,8	н.о.
	о. Русский	37	0	40,5	н.о.	2,7	5,4	н.о.
2018 г.	ВГО и НР	415	0,2	9,8	н.о.	2,7	0,9	н.о.
	о. Русский	34	2,9	32,4	н.о.	5,7	0	н.о.

* Здесь и в табл. 3: ВГО – Владивостокский городской округ, НР – Надеждинский район.

Таблица 3

Детекция РНК/ДНК возбудителей клещевых инфекций в крови лиц на 2–3-й день после присасывания иксодовых клещей на территориях, прилежащих к г. Владивостоку, в 2014–2018 гг.

Административные районы	Кол-во случаев, абс.	Кол-во возбудителей, %						
		Вирус КЭ	<i>B. miyamotoi</i>	<i>B. miyamotoi</i>	<i>A. phagocytophilum</i>	<i>E. chaffeensis</i> / <i>E. muris</i> -FL	Rickettsia spp.	
2014 г.	ВГО и НР	42	2,4	0	3,1	0	2,4	н.о.
	о. Русский	24	0	0	8,3	0	0	н.о.
2015 г.	ВГО и НР	100	0	0	4	0	0	н.о.
	о. Русский	7	0	0	0	0	0	н.о.
2017 г.	ВГО, НР и о. Русский	77	0	0	4,1	0	0	4,8
2018 г.	ВГО, НР и о. Русский	99	0	0	0	0	0	14,3

(QIAGEN, Германия). Выявление генетических маркеров риккетсий проводили при помощи тест-системы «РеалБест ДНК Rickettsia spp.», видовую принадлежность риккетсий определяли посредством набора «РеалБест ДНК Rickettsia sibirica / Rickettsia heilongjiangensis» (АО «Вектор-Бест», Новосибирск). ДНК *B. miyamotoi* детектировали с использованием набора «РеалБест ДНК *B. miyamotoi*» (АО «Вектор-Бест», Новосибирск) по инструкции производителя.

Применяли методы описательной статистики с вычислением средних арифметических величин и их стандартных ошибок ($M \pm s$). Достоверность различия средних оценивали на основе критерия Стьюдента (t).

Результаты исследования

С использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени выявлены генетические маркеры различных возбудителей вирусной и бактериальной природы. Истинную оценку активности и распространенности возбудителей клещевых инфекций можно сформировать при анализе следующих трех параметров: зараженность клещей, собранных с растительности, присосавшихся клещей, снятых с людей, а также проб крови лиц спустя 2–3 дня после укуса клеща.

При анализе материала, собранного на юго-восточных территориях Приморья, прежде всего, обращают на себя внимание крайне низкие показатели зараженности клещей вирусом КЭ и высокая степень инфицированности *B. burgdorferi* s.l. Зараженность клещей *I. persulcatus* на некоторых территориях была очень высокой и достигала 30–65%. Относительно невысокие показатели детектированных генетических маркеров, указывающих на инфицированность иксодовых клещей другими инфекциями, выявляли на всех изучаемых территориях Приморья (табл. 1).

Дополнительные данные по активности возбудителей получены при исследовании клещей, снятых после их присасывания. На о. Русский и на материковой территории, прилегающей к Владивостоку, частота детекции РНК вируса КЭ в присосавшихся клещах была выше по сравнению с клещами, собранными с растительности. Во все эпидемические сезоны высокие показатели были также отмечены для *B. burgdorferi* s.l. (табл. 2). На территориях, прилежащих к Владивостоку, они в 2014 г. в среднем равнялись $34,8 \pm 9,9\%$, в 2015 г. – $39,7 \pm 4,1\%$. В 2017 г. зараженность клещей стала снижаться (до $24,3 \pm 2,7\%$), еще ниже она стала в 2018 г. – $9,8 \pm 1,5\%$.

Менее информативными оказались данные, полученные при исследовании крови пациентов, взятой на

2–3-й день после присасывания клеща. Такую кровь чаще всего исследовали в случаях нарушения целостности или потери клеща. В крови в единичных случаях выявляли генетические маркеры возбудителей КЭ, моноцитарного эрлихиоза человека и клещевой возвратной лихорадки. Генетические маркеры клещевых риккетсиозов в крови в 2017–2018 гг. выявляли чаще, но только *R. heilongjiangensis* (табл. 3).

Обсуждение полученных данных

Известно, что Дальний Восток – высоко эндемичная территория в отношении КЭ. Однако в последнее десятилетие это представление стало меняться – заболеваемость КЭ резко снизилась, летальные исходы регистрировались в единичных случаях. В 2014 г. заболеваемость КЭ составила 0,87 на 100 тыс. населения, летальность – 6,6 %, в 2015 г. – 1,2 на 100 тыс. населения, летальных случаев не было. В 2016 г. зарегистрировано 25 случаев этого заболевания (1,37 на 100 тыс. населения), летальность составила 4 %, в 2017 г. – 28 случаев (1,5 на 100 тыс. населения), летальность – 7,1 %. В 2018 г. заболели 11 человек (0,43 на 100 тыс. населения), в одном случае наступил летальный исход (по данным на 01.09.2018 г.). Напрашивается предположение о том, что специфическая вакцинация могла повлиять на динамику в отношении КЭ, однако уровень привитости населения Приморья достигает лишь 29 %, что вряд ли способствует столь резкому снижению заболеваемости. Очевидно, причины снижения активности вируса в природных очагах другие – те, которые могут влиять на взаимоотношения возбудителей клещевых инфекций в хозяевах-резервуарах (в иксодовых клещах и мелких млекопитающих). Настоящими исследованиями выявлена взаимосвязь низких показателей зараженности ВКЭ иксодовых клещей с устойчиво невысокой заболеваемостью и летальностью при этой инфекции. Освободившуюся экологическую нишу ВКЭ стали занимать ранее неизвестные в патологии человека возбудители инфекционных заболеваний бактериальной природы. Ярким примером этого можно назвать иксодовые клещевые боррелиозы, вызываемые боррелиями группы *B. burgdorferi* s.l. Так же как и для ВКЭ, основными переносчиками этих боррелий служат клещи *I. persulcatus*, показатели их зараженности можно считать индикатором не только активности возбудителей в природных очагах, но и заболеваемости этой инфекцией. Показатель заболеваемости ИКБ на 100 тыс. населения в 2014 г. составил 5,8 (100 случаев), в 2015 г. отмечен рост в 1,5 раза – 8 (146 случаев), в 2016 г. – еще в 1,3 раза – 10,8 (197 случаев). В 2017 г. заболеваемость снизилась до 8,5 на 100 тыс. населения (158 случаев). На 1 сентября 2018 г. больных ИКБ зарегистрировано еще меньше – 90 человек (4,86 на 100 тыс. населения). Аналогичную динамику продемонстрировали показатели зараженности *B. burgdorferi* s.l. снятых с людей присосавшихся иксодовых клещей (табл. 2).

В числе других инфекций, передающихся через укусы клеща, в 2018 г. в Приморском крае зарегистрированы гранулоцитарный анаплазмоз – 10 случаев (0,54 на 100 тыс. населения), моноцитарный эрлихиоз – 2 случая (0,11 на 100 тыс. населения), клещевой риккетсиоз – 80 случаев (4,32 на 100 тыс. населения). Низкие показатели заболеваемости этими инфекциями также сочетаются с невысокими данными зараженности иксодовых клещей, как собранных с растительности, так и снятых с людей (табл. 1 и 2).

Несмотря на то, что официальная регистрация заболеваемости клещевой возвратной лихорадкой, вызванной *B. miyamotoi*, пока не установлена, случаи заболеваний, имеющих молекулярно-генетическое подтверждение, описаны на территории Приморского края [6].

Посредством полимеразной цепной реакции в режиме реального времени нами было показано существование на юго-восточной территории Приморского края шести возбудителей «клещевых» инфекций (КЭ, болезни Лайма, клещевой возвратной лихорадки, вызванной *B. miyamotoi*, гранулоцитарного анаплазмоза, мононуклеарного эрлихиоза и клещевых риккетсиозов). Чаще всего в иксодовых клещах детектировали боррелии (*B. burgdorferi* s.l. и *B. miyamotoi*). Единичными были находки генетических маркеров вируса КЭ, анаплазм, эрлихий. Кроме того, на этих территориях в 7,1–9,4 % случаев определялась ДНК риккетсий, но не *R. sibirica*, а *R. heilongjiangensis*, которую также находили в крови лиц после присасывания клеща и которая, по-видимому, играет ведущую роль в инфекционной патологии людей на Дальнем Востоке.

Обращает на себя внимание то, что на активную циркуляцию возбудителей ИКБ в природных очагах указывают данные о зараженности присосавшихся клещей и собранных с растительности. В то же время в крови пациентов на начальной стадии инфекционного процесса (на 2–3-й день после укуса клеща) ни в одном случае не удалось выявить ДНК возбудителей ИКБ. И это связано с тем, что в начальный период инфицирования возбудители этой инфекции локализуются в кожных покровах у места укуса [9]. В противоположность *B. burgdorferi* s.l. другая спирохета – *B. miyamotoi* – не формирует депо в кожных покровах и не образует патогномичного признака ИКБ – мигрирующей эритемы. Сразу после укуса клеща спирохета проникает в кровь и вызывает генерализованную форму инфекции [10]. Об этом свидетельствует выявление ДНК *B. miyamotoi* в крови людей на 2–3-й день после укуса клеща. Такую патогенетическую особенность необходимо учитывать при проведении анализов крови с помощью полимеразной цепной реакции, диагностирующих болезнь Лайма и клещевую возвратную лихорадку. Но и в этих случаях исследование крови данным методом не позволяет в первые дни после присасывания клеща диагностировать ИКБ.

Таким образом, можно резюмировать, что современный молекулярно-генетический метод (полимеразная

цепная реакция в режиме реального времени) показывает: клещевые инфекции к настоящему моменту представляют собой актуальную проблему и требуют дальнейшего тщательного изучения не только «старых», ранее известных микроорганизмов, но и новых, недавно открытых и, возможно, еще и неизвестных возбудителей клещевых природно-очаговых инфекций.

Работа выполнена в рамках научного проекта (0545-2014-0011)

Федерального агентства научных организаций.

Литература

1. Борисов В.А. Ющук Н.Д., Малов И.В., Аитов К.А. Особенности течения клещевого энцефалита в различных географических регионах. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2000. № 6. С. 26–33.
Borisov V.A. Yushchuk N.D., Malov I.V., Aitov K.A. Features of tick-borne encephalitis in various geographical regions // Epidemiology and Infectious Diseases. 2000. 6. P. 26–33.
2. Вергинина Е.В., Симонова Е.Г., Паксина Н.Д. Эпидемиологический мониторинг инфекций, передающихся клещами в 2013–2017 гг. // Медицинская вирусология. 2017. Т. 31, № 1. С. 13.
Verginina E.V., Simonova E.G., Paksina N.D. Epidemiological monitoring of tick-borne diseases in Russia during 2013–2017 // Medical Virology. 2017. Vol. 31, No. 1. P.13.
3. Зильбер Л.А. Весенний (весенне-летний) эпидемический клещевой энцефалит // Архив биологических наук. 1939. Т. 56, № 2. С. 9–37.
Zilber L.A. Spring (spring-summer) epidemical tick-borne encephalitis // Archiv Biologicheskikh Nauk. 1939. Vol. 56, No. 2. P. 9–37.
4. Кулешов К.В., Платонов А.Е., Гоптарь И.А. [и др.]. Секвенирование хромосом российских изолятов *Borrelia miyamotoi*, возбудителя «нового» иксодового клещевого боррелиоза // Молекулярная диагностика-2017: IX Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием. М., 2017. С. 187–188.
Kuleshov K.V., Platonov A.E., Goptar I.A. [et al.]. Sequencing of chromosomes of the Russian isolates *Borrelia miyamotoi*, the causative agent of the “new” ixodid tick-borne borreliosis // Molecular diagnostics 2017: IX All-Russian scientific-practical conference with international participation. Moscow, 2017. P. 187–188.
5. Леонова Г.Н. О нозологической однородности и эволюции клещевого энцефалита // Тихоокеанский медицинский журнал. 2010. № 3. С. 19–22.
Leonova G.N. About nosological homogeneity and evolution of tick-borne encephalitis / Pacific Medical Journal. 2010. No. 3. P. 19–22.
6. Леонова Г.Н., Бондаренко Е.И., Иванис В.А. [и др.]. Первые случаи заболевания, вызванного *Borrelia miyamotoi*, на Дальнем Востоке России // Эпидемиология и инфекционные болезни 2017. № 3. С. 57–64.
Leonova GN, Bondarenko E.I., Ivanis V.A. [et al.]. The first cases of the disease caused by *Borrelia miyamotoi*, in the Far East of Russia // Epidemiology and Infection Disease. 2017. No. 3. P. 57–64.
7. Онищенко Г.Г., Федоров Ю. М., Паксина Н.Д. Организация надзора за клещевым энцефалитом и меры по его профилактике в Российской Федерации // Вопросы вирусологии. 2007. № 5. С. 8–10.
Onishchenko G.G., Fedorov YU. M., Paksina N.D. Organization of supervision of tick-borne encephalitis and measures for its prevention in the Russian Federation // Voprosy virusologii. 2007. No. 5. P. 8–10.
8. Рудаков Н.В. Анаплазмы и анаплазмозы: руководство для врачей. Омск: Омский научный вестник, 2017. 100 с.
Rudakov N.V. Anaplasma and anaplasmosis: A guide for doctors. Omsk: Omsk Scientific Herald, 2017. 100 p.

9. Рудакова С.А. Современные методы молекулярной диагностики в изучении сочетанных природных очагов инфекций, передающихся иксодовыми клещами // Молекулярная диагностика. 2010. № 2. С. 267–270.

- Rudakova S.A. Modern methods of molecular diagnostics in the study of combined natural foci of infections transmitted by Ixodes ticks // Molecular Diagnostics. 2010. No. 2. P. 267–270.
10. Сарксян Д.С., Платонов А.Е., Карань Л.С. [и др.]. Клинические особенности «нового» клещевого боррелиоза, вызываемого *Borrelia miyamotoi* // Терапевтический архив. 2012. № 11. С. 34–41.
Sarksyant D.S., Platonov A.E., Karan L.S. [et al.]. Clinical presentation and of “new” borreliosis caused by *Borrelia miyamotoi* // Therapeutic archive. 2012. No. 11. P. 34–41.
 11. Heinz F.X., Collett M.S., Purcell R.H. [et al.]. Family Flaviviridae // Virus Taxonomy: 7th International committee for the Taxonomy of Viruses / Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carstens E. [et al.], eds. San Diego: Academic Press, 2000. P. 859–878.
 12. Леонова Г.Н., Кондратов И.Г., Терновое В.А. [и др.]. Характеризация Powassan вирусов из Дальнего Востока России // Arch. Virol. 2009. Vol. 154, No. 5. P. 811–820.
 13. Леонова Г.Н., Кондратов И.Г., Майстровская О.С. [и др.]. Louping ill virus (LIV) in the Far East // Arch. Virol. 2015. Vol. 160, No. 3. P. 663–673.
 14. Платонов А.Е., Карань Л.С., Кольяшников Н.М. [и др.]. Humans infected with relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia // Emerg. Infect. Dis. 2011. Vol. 17. P. 1816–1823.
 15. Yu Zhanga, Bing-Yin Si, Bo-Hua Liua [et al.]. Complete genomic characterization of two tick-borne encephalitis viruses isolated from China // Virus Research. 2012. Vol. 167. P. 310–313.

Поступила в редакцию 06.09.2018.

MONITORING CAUSATIVE AGENTS OF TICK-BORNE INFECTIONS IN PRIMORSKY KRAI (2014–2018)

G.N. Leonova¹, V.A. Lubova¹, V.A. Ivanis²

¹ Somov Institute of Epidemiology and Microbiology (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russian Federation), ² Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 690002 Russian Federation)

Objective. In the last decade, along with tick-borne encephalitis new previously unknown infections began to occur after tick bites in all regions of ixodid ticks. In the Primorsky Krai, studies in this direction began in 2014. The aim of this study was to assess evaluation of infestation by pathogens of tick-borne infections of humans and ixodid ticks in epidemic seasons 2014–2018 on the territories of natural foci of Primorsky Krai.

Methods. Assessment of the activity and prevalence of pathogens of tick-borne infections was obtained by analyzing the following three parameters: infection of ticks collected from vegetation, sucked ticks removed from people, and blood samples of individuals 2–3 days after the tick bite.

Results. Using a real-time PCR, we have shown the existence in the southeast of the Primorsky Krai of the six causative agents of tick-borne infections (TBE, Lyme disease, tick-borne recurrent fever caused by *Borrelia miyamotoi*, granulocyte anaplasmosis, mononuclear ehrlichiosis and tick-borne rickettsiosis). Most often in ixodid ticks detected borrelia (*Borrelia burgdorferi* s.l., and *Borrelia miyamotoi*). In single cases, genetic markers of TBE virus, anaplasma and erlichia have been identified. Besides, *Rickettsia heilongjiangensis* DNA was detected in these areas. The interrelation between infection of ixodid ticks with tick-borne pathogens and rates of morbidity in these infections in Primorsky Krai was established. **Conclusions.** The data obtained concentrate attention of researchers on a variety of existing tick-borne infections, which by now represent a new, urgent problem and require further careful study not only of “old” previously known pathogens but also new newly discovered and, perhaps, not yet discovered pathogens of tick-borne natural focal infections.

Keywords: causative agents of tick-borne infections, Primorsky Krai

Pacific Medical Journal, 2018, No. 4, p. 10–14.

УДК 616-097:578-06:616-002:612.017.1

DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2018.4.15-19

Углубление дефицита наивных Т-клеток CD4⁺ у пациентов с ВИЧ-инфекцией при коинфицировании вирусом гепатита С

К.В. Шмагель¹, Л.Б. Королевская¹, Е.В. Сайдакова¹, Н.Г. Шмагель^{1,2}¹ Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН (614081, г. Пермь, ул. Голева, 13),² Пермский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями (614088, г. Пермь, ул. Архитектора Связева, 21)

У пациентов, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), коинфицированных вирусом гепатита С и получающих антиретровирусную терапию, в большей степени, чем у ВИЧ-моноинфицированных субъектов, выражен дефицит наивных Т-клеток CD4⁺. Показано, что их недостаточность связана с уровнем активации иммунитета, активностью гепатита и степенью нарушения целостности печеночного барьера для микробных продуктов кишечника. Разные по степени зрелости наивные Т-клетки CD4⁺ имеют различную зависимость от процессов, вызванных гепатитом. Деструкция печеночной ткани больше влияет на недавних выходцев из тимуса. Рост концентрации бактериального липополисахарида в крови сопровождается снижением численности зрелых наивных Т-лимфоцитов CD4⁺. Полученные данные не раскрывают механизмы формирования дефицита наивных CD4⁺-клеток при коинфекции.

Ключевые слова: вирус иммунодефицита человека, гепатит С, наивные Т-лимфоциты, иммунная активация

Известно, что у пациентов, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) и коинфицированных вирусом гепатита С (ВГС), при антиретровирусной терапии может нарушаться восстановление численности Т-лимфоцитов CD4⁺ [7, 9, 11]. Ранее, оценивая изменения субпопуляционного состава клеток CD4⁺ и CD8⁺ на фоне приема препаратов, мы установили наличие у лиц с ВИЧ/ВГС-коинфекцией более глубокого по сравнению с ВИЧ-моноинфицированными субъектами дефицита численности Т-клеток CD4⁺ в крови [6]. Обнаруженная недостаточность числа этих лимфоцитов была связана с сокращением субпопуляции наивных клеток. Данный феномен может иметь важное фундаментальное и практическое значение, так как именно наивные (не имевшие контакта с антигеном) лимфоциты считаются основой для поддержания широты распознающего репертуара адаптивной иммунной системы [5]. Целью настоящей работы стал поиск возможных причин снижения численности Т-клеток CD4⁺ у пациентов с ВИЧ/ВГС-коинфекцией.

Материал и методы

Объектом исследования были ВИЧ-зараженные пациенты с ВГС-коинфекцией и без нее, получавшие антиретровирусную терапию не менее двух лет. При этом ВИЧ/ВГС-коинфицированные субъекты не принимали интерфероны. Кроме того, была сформирована группа, состоявшая из неинфицированных условно здоровых добровольцев. План работы был одобрен этическим комитетом Пермского краевого центра по борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями. Все обследованные дали письменное информированное согласие на участие в исследовании. Всего в наблюдение было включено 62 человека (табл.).

Шмагель Константин Владимирович – д-р мед. наук, зав. лабораторией экологической иммунологии Института экологии и генетики микроорганизмов – филиала ПФИЦ УрО РАН; e-mail: shmagel@iegm.ru

По таким характеристикам, как возраст, продолжительность инфицирования, длительность приема антиретровирусных препаратов, число Т-клеток CD4⁺ до начала лечения, различий между двумя группами ВИЧ-инфицированных установлено не было. Однако при сравнении групп ВИЧ⁺ВГС⁺ и ВИЧ⁺ВГС⁻ были обнаружены существенные отличия по полу и пути инфицирования. У коинфицированных пациентов преобладал парентеральный путь заражения, в то время, как моноинфицированные субъекты (в основном женщины) заражались преимущественно половым путем (табл.). Заражений путем гомосексуальных контактов не зарегистрировано.

Забор крови (27 мл) проводили натошак из локтевой вены в пробирки типа Vacutainer, содержавшие этилендиаминтетрауксусную кислоту. Мононуклеары крови получали путем центрифугирования в градиенте плотности диаколла («Диа-М»): $\rho = 1,077$. Предварительно кровь разводили в два раза средой RPMI-1640 (Sigma). Наслаивали два объема разведенной крови на один объем диаколла. Центрифугирование осуществляли в течение 40 мин. при 400g. Выделенные клетки собирали, дважды отмывали средой RPMI-1640, подсчитывали в камере Горяева. Лимфатические узлы были взяты у восьми ВИЧ-инфицированных: по четыре человека из каждой клинической группы. От четырех неинфицированных индивидуумов лимфоузлы были получены в результате диагностических процедур, выполненных по медицинским показаниям (материал любезно предоставлен лабораторией М. Ледермана – Западный резервный университет Кейза, Кливленд, США). Паховые лимфатические узлы забирала под местной анестезией. Из них в присутствии коллагеназы выделяли клетки, которые затем отмывали. Часть мононуклеарных клеток крови и клетки лимфатических узлов консервировали в инактивированной эмбриональной телячьей сыворотке (Gibco), содержащей 10% диметилсульфоксида (MP Biochemical),

Таблица

Клиническая характеристика обследованных

Показатель		Клиническая группа		
		ВИЧ+ВГС+	ВИЧ+ВГС-	ВИЧ-ВГС-
Число обследованных, абс.		21	21	20
в т.ч. мужчин, абс. (%)		10 (48)	4 (19)	8 (40)
Возраст, лет*		33 (30–36)	34 (31–42)	31 (26–35)
Пути передачи ВИЧ, абс. (%)	инъекционный	16 (76)	1 (5)	–
	половой	5 (24)	20 (95)	–
Продолжительность ВИЧ-инфекции, лет*		11 (8–12)	9 (7–11)	–
Продолжительность АРВТ**, лет*		4 (2–5)	4 (3–5)	–
Число клеток CD4 ⁺ , мкл ⁻¹ *	до лечения	140 (120–170)	170 (140–180)	–
	на момент обследования	450 (400–540)	540 (450–610)	1050 (660–1280)
Уровень ВИЧ в крови, копий/мл		<50	<50	–
Уровень ВГС в крови, log ₁₀ копий/мл*		6,25 (2,88–6,62)	<2,28***	<2,28***

* Медиана с интерквартильным размахом (в скобках).

** АРВТ – антиретровирусная терапия.

*** Предел чувствительности метода.

замораживали до –80 °С, а затем переносили в жидкий азот.

Уровни вирусной нагрузки ВИЧ и ВГС определяли соответственно методом разветвленной ДНК-гибридизации наборами Versant HIV-1 RNA 3.0 assay b на анализаторе Versant 440 (Siemens) и методом полимеразной цепной реакции в реальном времени наборами «ОТ Гепатоген С количественно» (ДНК-Технология) на термоциклере iCycler IQ5 (BioRad). Активности аспаратаминонотрансферазы и аланинаминотрансферазы исследовали кинетическим методом наборами Thermo Fisher. Концентрации бактериального липополисахарида оценивали хромогенным набором Uden (Голландия).

Определение численности клеток CD4⁺ проводили на проточном цитофлюориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с использованием набора моноклональных антител Becton Dickinson Immunocytometry Systems Simultest. Это исследование выполнено на свежих незамороженных клетках. По его результатам рассчитывали абсолютное и относительное количество Т-лимфоцитов CD4⁺ в цельной крови. Сравнительный анализ субпопуляционного состава Т-лимфоцитов крови проводили после размораживания клеток (хранившихся в жидком азоте) и стабилизации их при комнатной температуре. Исследование выполняли на приборе LSR II (Becton Dickinson). Для идентификации клеточных субпопуляций использовали меченные флуорохромами моноклональные антитела анти-CD3-PerCP, анти-CD4-AF700, анти-CD27-APC-Cy7, анти-CD45RA-APC, анти-CCR7-PE-Cy7. Наивными Т-лимфоцитами считали клетки CD4⁺, несущие маркеры CD27, CD45RA, CCR7. Наивные Т-клетки CD4⁺, экспрессирующие CD31 (анти-CD31-FITC), относили к так называемым недавним тимическим мигрантам (RTE – recent thymic emigrants). Дополнительно для оценки уровня активации Т-лимфоцитов CD4⁺ на их поверхности с помощью

антител (анти-HLA-DR-FITC и анти-CD38-PE) были определены маркеры активации. Все диагностические антитела, а также изотипические контроли были получены от Becton Dickinson (США).

Статистические расчеты проводили с использованием непараметрических методов. Для сравнения показателей двух групп применяли способ Манна-Уитни. Вычисляли медианы, интерквартильные и 10–90 %-ные размахи. Корреляционный анализ выполняли по методу Спирмена. Проведение статистического анализа и оформление графиков осуществляли с использованием компьютерной программы Statistica 6.

Результаты исследования

Установленный нами ранее факт углубления под влиянием ВГС-коинфицирования снижения наивных CD4⁺-лимфоцитов крови при ВИЧ-инфекции мог быть отражением перераспределения иммунокомпетентных клеток между лимфоидными органами и циркуляторным руслом. Для проверки гипотезы о том, что наличие выраженного дефицита наивных Т-лимфоцитов CD4⁺ у ВИЧ/ВГС-коинфицированных субъектов – не локальный феномен, выявленный только для клеток крови, было проведено сравнение содержания этих клеточных элементов в крови и лимфатических узлах. В результате было установлено, что при ВИЧ/ВГС-коинфекции, как в крови, так и в лимфатических узлах развивается существенная недостаточность численности наивных Т-лимфоцитов (рис. 1). Количество наивных элементов и в крови, и в лимфоидных органах у лиц с сочетанной инфекцией было статистически значимо снижено по сравнению с показателями при моноинфекции и у неинфицированных. Эти данные свидетельствуют о том, что дефицит наивных Т-клеток у коинфицированных больных можно считать

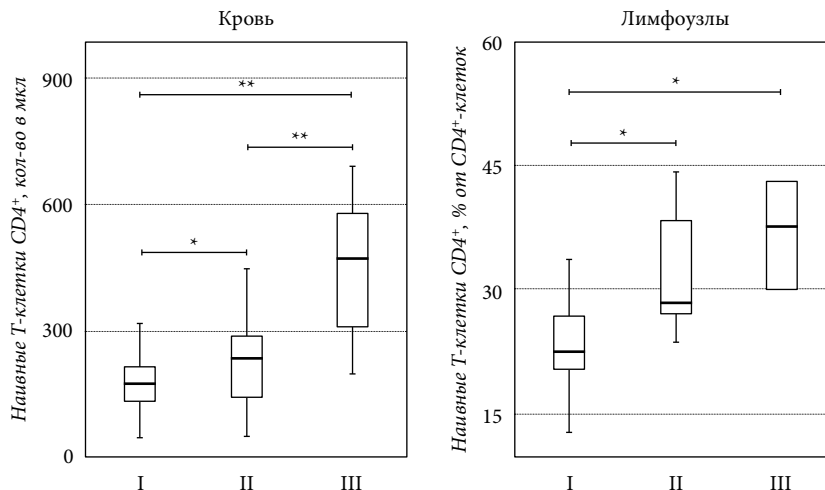


Рис. 1. Развитие дефицита наивных Т-лимфоцитов CD4⁺ у ВИЧ-инфицированных, коинфицированных ВГС:

представлены медианы (горизонтальные линии), интерквартильные интервалы (прямоугольники) и 10–90%-ные размахи (вертикальные отрезки) содержания клеток CD4⁺ в крови и лимфатических узлах в трех клинических группах: I – ВИЧ/ВГС-коинфекция, II – ВИЧ-моноинфекция, III – неинфицированные субъекты; **p*<0,05; ***p*<0,001 (U-тест Манна-Уитни).

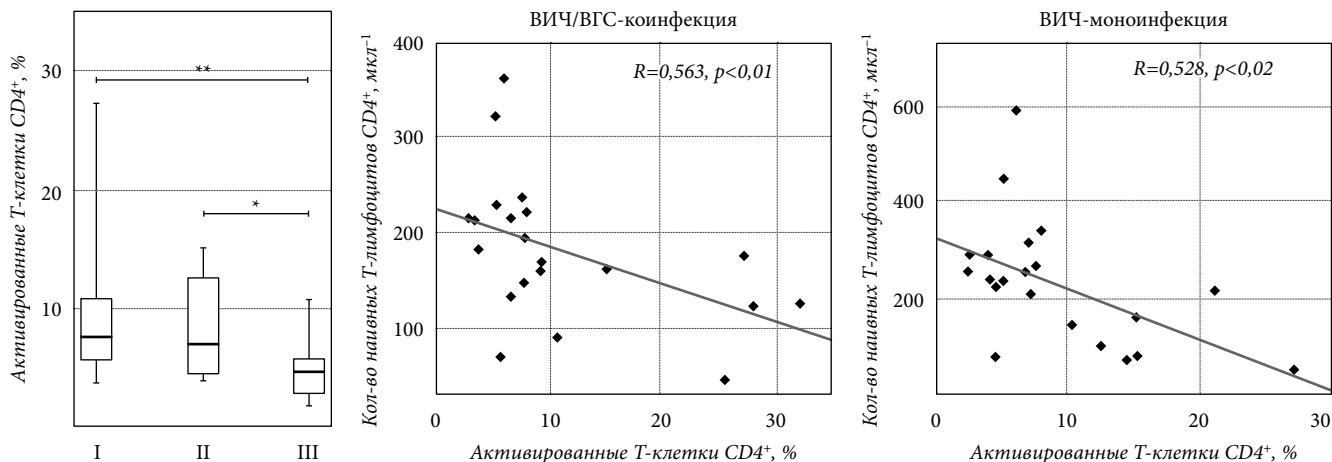


Рис. 2. Активация Т-лимфоцитов CD4⁺ и ее связь с количеством наивных Т-клеток CD4⁺ у ВИЧ-инфицированных пациентов, коинфицированных ВГС:

на графике слева отражены уровни активации (одновременная экспрессия CD38 и HLA-DR) Т-лимфоцитов CD4⁺ в трех клинических группах: I – ВИЧ/ВГС-коинфекция, II – ВИЧ-моноинфекция, III – неинфицированные субъекты. Представлены медианы (горизонтальные линии), интерквартильные интервалы (прямоугольники) и 10–90%-ные размахи (вертикальные отрезки). **p*<0,05; ***p*<0,001 (U-тест Манна-Уитни); на двух графиках справа – результаты корреляционного анализа зависимости числа наивных Т-клеток CD4⁺ от уровня активации Т-лимфоцитов CD4⁺ в двух группах ВИЧ-инфицированных пациентов: точки – индивидуальные значения, прямая – линия регрессии (коэффициенты корреляции и показатели статистической значимости получены с использованием метода ранговых корреляций Спирмена).

истинным, распространяющимся на всю периферическую адаптивную иммунную систему.

Далее возник вопрос о причинах формирования недостаточности этих лимфоцитов. В качестве одного из предположений рассматривалась негативная роль иммунной активации, которая, как известно, способна не только вызывать гибель клеток [2], но и приводить к повышению уровня летальности пациентов [4]. На основании экспрессии маркеров HLA-DR и CD38 был проведен анализ активации CD4⁺-клеток (рис. 2). Было установлено, что у ВИЧ-инфицированных, как коинфицированных, так и не коинфицированных ВГС, активация Т-лимфоцитов CD4⁺ крови существенно превышала значение данного показателя у людей без инфекции. Вместе с тем, между группами ВИЧ+ВГС⁺

и ВИЧ+ВГС⁻ статистически значимых различий выявлено не было. Однако то, что при ВИЧ-инфекции иммунная активация способна оказывать отрицательное влияние на численность наивных Т-клеток, было обнаружено после проведения корреляционного анализа зависимости числа наивных CD4⁺-лимфоцитов крови от содержания Т-клеток CD4⁺, одновременно экспрессирующих HLA-DR и CD38 (рис. 2). Таким образом, мы подтвердили предположение о возможной роли иммунной активации в снижении количества наивных Т-лимфоцитов. Однако ее приоритетного значения в формировании дефицита данной субпопуляции клеток при ВИЧ/ВГС-коинфекции обнаружено не было.

Еще одной причиной уменьшения численности наивных Т-лимфоцитов CD4⁺ может быть сокращение

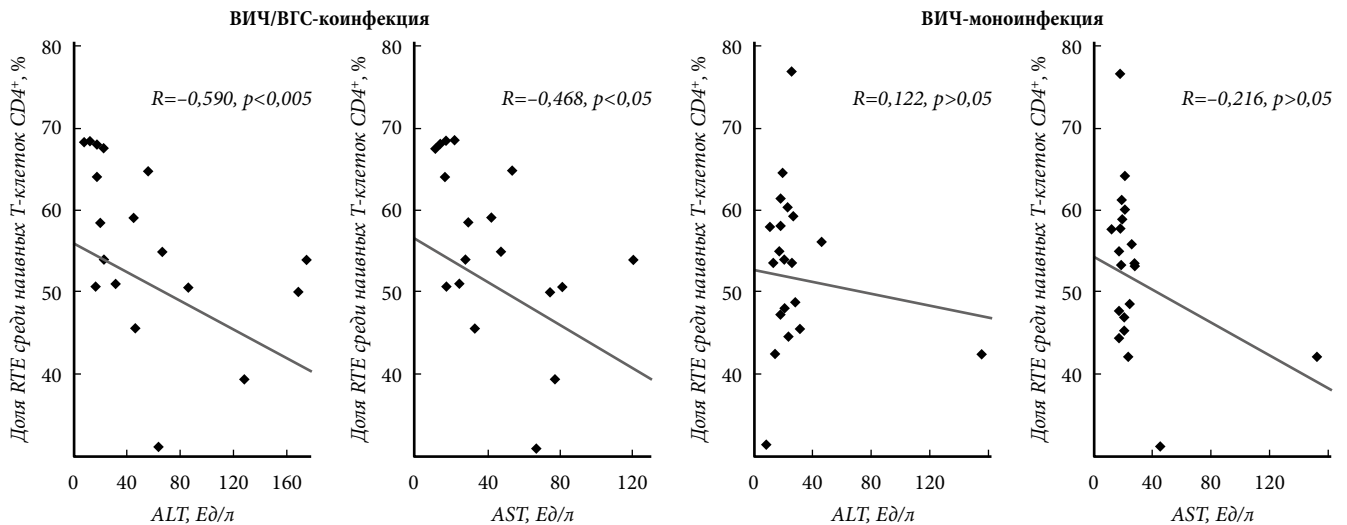


Рис. 3. Зависимость относительного содержания тимических мигрантов среди наивных Т-клеток CD4⁺ от активности трансаминаз у ВИЧ-инфицированных пациентов, коинфицированных ВГС:

результаты корреляционного анализа зависимости доли RTE в пуле наивных Т-клеток CD4⁺ от уровня активности аланинаминотрансферазы (ALT) и аспартатаминотрансферазы (AST) плазмы крови в двух группах ВИЧ-инфицированных: точки – индивидуальные значения, прямая – линия регрессии (коэффициенты корреляции и показатели статистической значимости получены с использованием метода ранговых корреляций Спирмена).

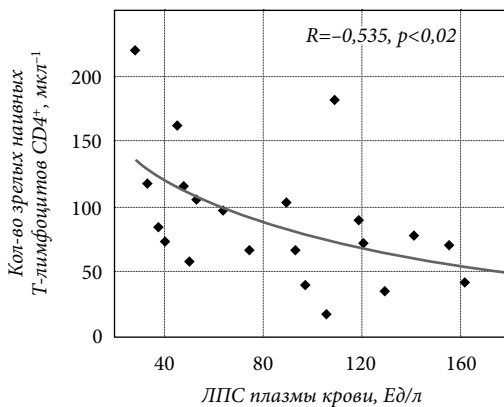


Рис. 4. Зависимость численности зрелых наивных Т-лимфоцитов CD4⁺ от уровня липополисахарида (ЛПС) плазмы крови у пациентов с ВИЧ/ВГС-коинфекцией:

зрелые наивные Т-лимфоциты CD4⁺ – наивные CD4⁺-клетки, не несущие на маркер CD31; точки – индивидуальные значения (коэффициенты корреляции и показатели статистической значимости получены с использованием метода ранговых корреляций Спирмена).

продуктивной функции вилочковой железы. Ранее при исследовании уровня эписомальных кольцевых ДНК, образующихся при реарранжировке генов, кодирующих цепи Т-клеточного рецептора, мы обнаружили у ВИЧ/ВГС-коинфицированных пациентов более слабый выход из тимуса Т-клеток CD4⁺ по сравнению с показателем больных, зараженных только ВИЧ [8]. Причина этого явления до сих пор остается невыясненной. Нами была проверена гипотеза о влиянии активности гепатита на продукцию Т-лимфоцитов CD4⁺ вилочковой железой. Корреляционный анализ между уровнями трансаминаз с одной стороны, и относительным содержанием RTE в пуле наивных CD4⁺-клеток крови – с другой, показал, что при ВИЧ/ВГС-коинфекции между этими показателями существует обратная статистически значимая зависимость (рис. 3). Следует также отметить, что

у ВИЧ-моноинфицированных аналогичных связей обнаружено не было.

Ранее мы установили, что у ВИЧ/ВГС-коинфицированных из-за нарушения целостности печеночного барьера усилена по сравнению с ВИЧ-моноинфицированными пациентами микробная транслокация из кишечника [10]. При этом ведущим маркером, отражающим поступление бактериальных продуктов в кровоток, оказался бактериальный липополисахарид. Исходя из этого, мы проанализировали связь численности наивных Т-лимфоцитов CD4⁺ крови с концентрацией микробного продукта. Корреляционный анализ не выявил зависимости между содержанием RTE и уровнем липополисахарида. Однако проверка связи между числом зрелых наивных Т-клеток CD4⁺ (утративших маркер CD31) и концентрацией в плазме липополисахарида показала существование статистически значимой зависимости между ними в группе ВИЧ⁺ВГС⁺ (рис. 4). У лиц с ВИЧ-моноинфекцией такая зависимость отсутствовала. Эти данные свидетельствуют о том, что при ВИЧ/ВГС-коинфекции на уровень наивных Т-лимфоцитов помимо активности гепатита может оказывать влияние поступление в кровоток бактериальных продуктов из кишечника.

Обсуждение полученных данных

Представленный феномен углубления дефицита наивных Т-клеток CD4⁺ у ВИЧ-инфицированных пациентов, коинфицированных ВГС, ранее уже отмечен в литературе [9]. Однако это было продемонстрировано только на лимфоцитах крови. Проведенное нами исследование лимфатических узлов позволило установить, что сокращение числа этих клеток при ВИЧ/ВГС-коинфекции характерно для всей иммунной системы. Причины данного явления до сих пор не рассматривались. Мы впервые обратили внимание на то, что при ВИЧ/

ВГС-коинфекции в большей степени, чем при ВИЧ-моиноинфекции может нарушаться продуктивная функция вилочковой железы [8]. Здесь следует отметить, что для субъектов с изолированной ВГС-инфекцией возможность развития дисфункции тимуса была известна еще с 2005 г., что было зафиксировано по результатам определения в крови кольцевых ДНК Т-клеточного рецептора [1]. Позднее этот факт был подтвержден другими авторами на основе оценки численности RTE путем определения маркера CD31 на поверхности наивных лимфоцитов [3, 12]. Была также установлена негативная связь между количеством наивных CD4⁺-клеток крови и уровнем аланинаминотрансферазы [12].

Важно отметить, что в нашей работе снижение численности наивных Т-лимфоцитов CD4⁺ у ВИЧ/ВГС-коинфицированных коррелировало с уровнем активации иммунитета, а не с активностью печеночных ферментов. Разделение наивных CD4⁺-клеток на основе маркера CD31 на незрелые (CD31⁺) и зрелые (CD31⁻) выявило разную степень их зависимости от патогенетических индикаторов гепатита. Изменение численности RTE было связано с трансаминазами плазмы крови, отражающими степень повреждения печени. Содержание зрелых наивных Т-лимфоцитов CD4⁺ зависело от уровня бактериального липополисахарида в плазме крови, который определяется микробной транслокацией из кишечника и состоянием печеночного барьера.

Приведенные данные демонстрируют не только неоднородность пула наивных Т-клеток CD4⁺, но и разную чувствительность входящих в их состав субпопуляций к различным факторам. Понимание этого требует усложнения экспериментальных подходов и аккуратности в теоретических умозаключениях. Вместе с тем, утяжеление дефицита наивных Т-лимфоцитов CD4⁺ при ВИЧ/ВГС-коинфекции можно считать актуальной проблемой, так как этот феномен сопровождается ускоренным старением организма и сокращением времени жизни пациентов.

Работа выполнена при поддержке Комплексной программы УрО РАН; номер госрегистрации темы: АААА-А18-118030790046-9.

Литература / References

1. Cianci R., Pinti M., Nasi M. [et al.]. Impairment of recent thymic emigrants in HCV infection // *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 2005. Vol. 18, No. 4. P. 723–728.
2. Funderburg N., Luciano A.A., Jiang W. [et al.]. Toll-like receptor ligands induce human T cell activation and death, a model for HIV pathogenesis // *PLoS One.* 2008. Vol. 3. P. e1915.
3. Hartling H.J., Gaardbo J.C., Ronit A. [et al.]. Impaired thymic output in patients with chronic hepatitis C virus infection // *Scand. J. Immunol.* 2013. Vol. 78, No. 4. P. 378–386.
4. Hunt P.W., Sinclair E., Rodriguez B. [et al.]. Gut epithelial barrier dysfunction and innate immune activation predict mortality in treated HIV infection // *J. Infect. Dis.* 2014. Vol. 210, No. 8. P. 1228–1238.
5. Kohler S., Thiel A. Life after the thymus: CD31⁺ and CD31⁻ human naive CD4⁺ T-cell subsets // *Blood.* 2009. Vol. 113, No. 4. P. 769–774.
6. Korolevskaya L.B., Shmagel K.V., Saidakova E.V. [et al.]. Effect of hepatitis C virus coinfection on the content of CD4(+) and CD8(+) T cell subpopulations in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2016. Vol. 161, No. 2. P. 281–283.

7. Potter M., Oduyungbo A., Yang H. [et al.]. Impact of hepatitis C viral replication on CD4⁺ T-lymphocyte progression in HIV-HCV coinfection before and after antiretroviral therapy // *AIDS.* 2010. Vol. 24, No. 12. P. 1857–1865.
8. Saidakova E.V., Korolevskaya L.B., Shmagel N.G. [et al.]. Role of hepatitis C virus coinfection in violation of productive thymic function in HIV-infected patients under immunologically inefficient antiretroviral therapy // *Med. Immunology (Rus.).* 2013. Vol. 15, No. 6. P. 543–552.
9. Santin M., Mestre M., Shaw E. [et al.]. Impact of hepatitis C virus coinfection on immune restoration during successful antiretroviral therapy in chronic human immunodeficiency virus type 1 disease // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2008. Vol. 27, No. 1. P. 65–73.
10. Shmagel K.V., Saidakova E.V., Shmagel N.G. [et al.]. Systemic inflammation and liver damage in HIV/hepatitis C virus coinfection // *HIV Med.* 2016. Vol. 17, No. 8. P. 581–589.
11. Taye S., Lakew M. Impact of hepatitis C virus co-infection on HIV patients before and after highly active antiretroviral therapy: an immunological and clinical chemistry observation, Addis Ababa, Ethiopia // *BMC Immunol.* 2013, Vol. 14. doi: 10.1186/1471-2172-14-23.
12. Yonkers N.L., Sieg S., Rodriguez B., Anthony D.D. Reduced naive CD4 T cell numbers and impaired induction of CD27 in response to T cell receptor stimulation reflect a state of immune activation in chronic hepatitis C virus infection // *J. Infect. Dis.* 2011. Vol. 203, No. 5. P. 635–645.

Поступила в редакцию 06.09.2018.

DEFICIT DEEPENING OF NAIVE T-CELLS CD4⁺ IN PATIENTS WITH HIV INFECTION WHEN CO-INFECTED WITH HEPATITIS C VIRUS

K.V. Shmagel¹, L.B. Korolevskaya¹, E.V. Saydakova¹, N.G. Shmagel^{1,2}

¹ Perm Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (13 Goleva St. Perm 614081 Russian Federation), AIDS Prevention Centre (21 Arhitektora Sviyazeva St. Perm 614088 Russian Federation)

Objective. In patients infected with the human immunodeficiency virus (HIV) and co-infected with the hepatitis C virus (HCV), CD4⁺ T-cell deficiency is more pronounced compared to HIV mono-infected subjects, due to a reduction in their naive subpopulation. This work is devoted to establishing the causes of the development of insufficiency of these cells.

Methods. Two groups of HIV-infected persons were examined: HIV+HCV+ (n=21) and HIV+HCV- (n=21) receiving antiretroviral drugs for more than two years (HIV level <50 copies/ml). Anti-HCV therapy was not conducted. The control group (n=20) consisted of uninfected volunteers. The number of naive CD4⁺ T cells, the proportion of these included RTE (recent thymic emigrants; CD31⁺), the content of activated CD4⁺ T-lymphocytes (HLA-DR⁺ CD38⁺), the concentration in the blood of bacterial lipopolysaccharide, the activity of transaminases.

Results. Immune activation negatively affected the number of naive CD4⁺ T cells in both groups of HIV-infected. However, only in the HIV+HCV+ group the inverse relationship between the activity of transaminases, on the one hand, and the proportion of RTE on the other hand ($R_{ALT-RTE} = -0.590$, $p < 0.005$ and $R_{AST-RTE} = -0.468$, $p < 0.05$), and also the level of lipopolysaccharide and the number of mature (CD31⁻) naive CD4⁺ T-lymphocytes ($R = -0.535$, $p < 0.02$).

Conclusions. Thus, hepatitis activity and increased microbial translocation from the intestine in HIV/HCV co-infection may have a negative effect on the number of naive CD4⁺ T cells. Naive elements of varying degrees of maturity are apparently affected. Specific mechanisms for the formation of a deficit of naive CD4⁺ T-lymphocytes in HIV/HCV-co-infected individuals have yet to be established.

Keywords: human immunodeficiency virus, hepatitis C, naive T-lymphocytes, immune activation

Pacific Medical Journal, 2018, No. 4, p. 15–19.

УДК [618.3–06:618.98:578.825.12]–076:577.175.632

DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2018.4.20–23

Прогестерон и его 5 β -метаболит – маркеры угрожающего течения беременности при цитомегаловирусной инфекции

И.В. Довжикова, И.А. Андриевская, К.К. Петрова, М.Т. Луценко

Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания (675000, г. Благовещенск, Калинина, 22)

Для оценки влияния обострения цитомегаловирусной (ЦМВ) инфекции на содержание прогестерона, его рецептора и метаболита 5 β -дигидропрогестерона обследованы ворсинчатые хорионы, взятые при самопроизвольных и медицинских абортах на сроке 9–11 недель от женщин с обострением ЦМВ-инфекции. Контроль: 35 ворсинчатых хорионов беременных с ЦМВ-инфекцией в латентной стадии, взятых при проведении медицинских аборт на сроке 9–11 недель. Обострение ЦМВ инфекции приводило к снижению продукции прогестерона, уменьшению содержания рецептора в плаценте, а также уменьшению активности превращения прогестерона в 5 β -дигидропрогестерон в трофобласте ворсинчатых хорионов. Таким образом, по мнению авторов, формируется угроза преждевременного прерывания беременности.

Ключевые слова: ворсинчатый хорион, прогестерон, рецептор прогестерона, 5 β -дигидропрогестерон

При цитомегаловирусной (ЦМВ) инфекции наиболее частым осложнением первого триместра гестации считается угроза прерывания беременности [2]. Ее следствием может быть спонтанный аборт или, в случае пролонгирования гравидарного периода, – развитие плацентарной недостаточности и внутриутробное страдание плода. Этиологическая структура угрозы прерывания беременности разнообразна, а в случае ЦМВ-инфекции полностью не установлена.

Общепризнано, что прогестерон поддерживает успешное течение беременности [6, 7]. Он необходим для облегчения имплантации (активация лизирующих ферментов), для поддержания беременности (стимуляция роста матки и маточно-плацентарного ангиогенеза, сохранение тонуса матки в состоянии покоя) и для обеспечения иммунной толерантности организма. Кроме этого, было показано, что для сохранения беременности необходим не только прогестерон, но и его метаболиты, особое значение среди которых имеет 5 β -дигидропрогестерон – самое мощное токолитическое соединение из всех стероидов [1]. Следует упомянуть и рецептор прогестерона, ведь именно его модуляция является причиной 70 % случаев невынашивания беременности [5].

Целью нашей работы была оценка влияния обострения ЦМВ-инфекции на содержание прогестерона, его рецептора и метаболита 5 β -дигидропрогестерона в ранней плаценте при различном течении беременности.

Материал и методы

Материалом для исследования послужили 30 ворсинчатых хорионов, взятых при выскабливании полости матки при начавшемся выкидыше в сроке 9–11 недель беременности при обострении ЦМВ-инфекции (основная группа), а также 30 ворсинчатых хорионов,

взятых при проведении медицинских аборт на том же сроке гестации от женщин с обострением хронической ЦМВ-инфекции (группа сравнения). Контрольную группу составили 35 ворсинчатых хорионов беременных с хронической латентной ЦМВ-инфекцией, взятых при медицинских абортах на сроке 9–11 недель.

Критериями включения в исследование стали хроническая ЦМВ-инфекция (обострение на первом триместре беременности или латентное течение) и стойкая клиническая ремиссия герпесвирусной инфекции. Критерии исключения: первичная ЦМВ-инфекция, обострение другой воспалительной экстрагенитальной патологии, наличие инфекций, передающихся половым путем, возраст старше 27 лет, аномалии половых путей, одна и более потеря плода при сроке более 10 недель беременности в анамнезе.

Для установления клинического диагноза обострения хронической ЦМВ-инфекции проводили комплексное лабораторное тестирование периферической крови, соскобов буккального эпителия и слизистой оболочки шейки матки на присутствие ДНК цитомегаловируса, иммуноглобулина (Ig) класса М, индекса avidности IgG (более 50 %).

При исследовании учитывались требования Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных исследований с участием человека» с поправками 2013 г. и правилами клинической практики, утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 200н от 1 апреля 2016 г. Работа одобрена комитетом по биомедицинской этике при ДНЦ ФПД, от всех обследуемых получено информированное согласие.

Определение ЦМВ, верификацию типоспецифических антител и индекса avidности осуществляли методами иммуноферментного анализа на спектрофотометре Stat Fax-2100 (США) с помощью тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск), ДНК ЦМВ выявляли методом полимеразной цепной реакции на аппарате ДТ-96 с использованием наборов НПО

Довжикова Инна Викторовна – д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник ДНЦ ФПД; e-mail: dov_kova100@rambler.ru

«ДНК-технология» (Москва). Содержание прогестерона определяли на спектрофотометре Stat Fax-2100 (США) с помощью набора ООО «Хема-Медика» (Россия). Детекцию рецепторов прогестерона выполняли методом иммуноферментного анализа на спектрофотометре Stat Fax-2100 (США) с использованием наборов Cloud-Clone Corporation (США). Активность дегидрогеназы 5 β -дигидропрогестерона (5 β -прегнен-3,20-диона) определяли на криостатных срезах свежемороженой нефиксированной ткани гистохимическим методом по прописи Лойда [3]. Полученные данные анализировали с помощью программы Scion (США) на цифровом микроскопе MEIJI (Япония). Эхографическое обследование проводилось на аппарате SonoScape S6 в режиме импульсного и цветного доплеровского картирования.

Статистический анализ и обработка данных осуществлялись посредством пакета прикладных программ Statistica 6. Характеристика вариационных рядов: средняя арифметическая (M), стандартная ошибка (s), 95 %-ный коэффициент вариации, доверительный интервал для средних, где *t* определялось по таблице граничных значений критерия Стьюдента на уровне 95 % и числе степеней свободы $F = n_1 + n_2 - 2$. Для определения достоверности различий использовались непарный параметрический критерий Стьюдента и критерий Фишера. Принимались во внимание значения *p* менее 0,05, 0,01 и 0,001. Для определения достоверности различий в случае негауссовых распределений применяли непараметрические критерии Колмогорова–Смирнова.

Результаты исследования

У всех беременных основной группы уровень антител IgM к ЦМВ повышался до $2,0 \pm 0,7$ ЕД/мл. При этом титр антител IgG к ЦМВ держался на уровне 1:1600, что было значительно выше, чем в контрольной группе. Средние значения индекса avidности антител IgG к ЦМВ находились на уровне 88 ± 1 %, что указывало на реактивацию хронической ЦМВ-инфекции и возможные нарушения в созревании специфического по отношению к ЦМВ IgG, усиливавшие антигенную нагрузку. ДНК ЦМВ во всех случаях обнаруживался в содержимом цервикального канала, что увеличивало риск вертикального инфицирования провизорных и эмбриональных клеточных структур. Подтверждением этому стало выявление в 27 % случаев ДНК ЦМВ в ворсинчатом хорионе у представителей основной группы.

В группе сравнения уровень антител IgM к ЦМВ был значительно ниже, чем в основной группе – $0,7 \pm 0,2$ ЕД/мл. Значения титра антител IgG к ЦМВ в 85,7 % случаев были на уровне 1:800, у 14,3 % женщин составили – 1:1600. Индекс avidности антител IgG не превышал 96 ± 1 %. В 11,4 % случаев ДНК ЦМВ выявлялась в содержимом цервикального канала и в 88,6 % случаев – в буккальном соскобе, что значительно отличалось от основной группы и свидетельствовало об активации

хронической инфекции, но с более низким уровнем вирусной нагрузки.

В контрольной группе все беременные имели в крови только типоспецифические антитела IgG к ЦМВ с титром 1:400, что значительно ниже, чем в основной и группе сравнения. Индекс avidности значительно не отличался от показателя группы сравнения – $97 \pm 1,3$ % ($p > 0,05$). ДНК ЦМВ в биологическом материале женщин этой группы не выявлялся.

Характер течения беременности у всех представителей основной группы клинически характеризовался тянущими болями внизу живота и кровянистыми выделениями из половых путей. По данным ультразвукового исследования выявлены: гипертонус миометрия (у 80 % женщин), ретрохориальная гематома (у 68 % женщин) и предлежание хориона (у 70 % женщин).

В группе сравнения в 60 % случаев диагностирована угроза прерывания беременности, клинически сопровождавшаяся тянущими болями внизу живота (у 68 % женщин) и мажущими кровянистыми выделениями из половых путей (у 47 % женщин). По данным сонографии были диагностированы: гипертонус миометрия (у 41 % женщин), ретрохориальная гематома (у 24 % женщин) и предлежание хориона (у 48 % женщин).

Клинические признаки угрозы прерывания беременности в контрольной группе диагностированы у 18 % обследуемых, что иногда сопровождалось тянущими болями внизу живота (у 8 % женщин). Гипертонус миометрия выявлен в 8 %, предлежание хориона – в 5 % случаев.

При обострении ЦМВ-инфекции в периферической крови беременных концентрация прогестерона уменьшилась почти на 40 % по сравнению с контрольной группой (табл.). У женщин, чья беременность закончилась самопроизвольным абортom, регистрировалось более выраженное снижение концентрации гормона.

Плацента в период беременности играет роль железы внутренней секреции и синтезирует гормоны, используя материнские и плодовые предшественники. Поэтому оценка гормонального статуса непосредственно в самом органе полнее отразит процессы синтеза гормонов. По нашим данным, содержание

Таблица

Содержание прогестерона, 5 β -дигидропрогестерона, рецептора прогестерона при беременности, осложненной обострением ЦМВ-инфекции

Группа	Прогестерон, нмоль/л		Рецептор прогестерона, нмоль/л	5 β -дигидропрогестерон, усл. ед.
	в крови	в плаценте		
Контроль	103,7 \pm 3,2	53,4 \pm 3,7	18,5 \pm 0,9	41,3 \pm 3,0
Основная	44,6 \pm 2,2	12,8 \pm 0,9	11,3 \pm 0,9	24,8 \pm 2,1
Сравнения	63,3 \pm 2,0	21,5 \pm 2,7	14,0 \pm 0,8	30,9 \pm 2,6

Примечание: все показатели основной группы и группы сравнения статистически значимо отличались от контроля.



Рис. Активность дегидрогеназы 5β-дигидропрогестерона в ворсинчатом хорионе на 8–10-й неделях беременности: а – контроль, $41,3 \pm 3,0$ усл. ед.; б – снижение интенсивности реакции ($30,9 \pm 2,6$ усл. ед.) в группе сравнения; в – выраженное снижение интенсивности реакции ($24,8 \pm 2,1$ усл. ед.) в основной группе. Гистохимия, $\times 400$.

прогестерона непосредственно в самой плаценте также существенно изменялось (табл.). Концентрация стероида в гомогенате ворсинчатых хорионов, полученных в результате выкидыша, уменьшилась почти на 75 % по сравнению с показателями контрольной группы.

Следует отметить, что наличие в организме достаточного количества гормона не гарантирует того, что его эффекты будут исполняться, если прогестерон не сможет вступить в контакт со своими рецепторами. Обострение ЦМВ-инфекции в начале беременности оказывало влияние на содержание рецептора к прогестерону в ворсинчатом хорионе. Оно уменьшилось на 25 % по сравнению с контрольной группой при обострении ЦМВ-инфекции. В основной группе содержание рецепторов прогестерона снизилось почти на 40 % (табл.).

Существует мнение, что для реализации действия прогестерона через рецепторы необходимо адекватное количество одного из прогестероновых метаболитов – 5β-дигидропрогестерона. В случае его снижения, в А- и В-циклогексановых кольцах стероида происходят изменения, уменьшающие эффективность связывания этого гормона с рецепторами [4]. Кроме этого, 5β-дигидропрогестерон сохраняет тонус миометрия в состоянии покоя и совместно с прогестероном поддерживает адекватное кровообращение в плаценте, пупочных артериях и венах [8, 10]. Была проведена гистохимическая реакция, отражающая интенсивность превращения прогестерона в 5β-дигидропрогестерон в плаценте. Активность реакции в трофобласте ворсинчатого хориона при обострении ЦМВ-инфекции снижалась на 25 % в сопоставлении с контрольной группой. Наиболее выраженные изменения были отмечены в материале, полученном в результате самопроизвольного аборта, у беременных с реактивацией инфекционного процесса (рис.). Цитофотометрический показатель в основной группе исследования уменьшился почти на 40 % по сравнению с данными контрольной группы.

Обсуждение полученных данных

Обострение ЦМВ-инфекции во время беременности приводило к снижению продукции прогестерона и уменьшению содержания его рецептора в плаценте. Так как при низком уровне прогестерона и слабой

чувствительности рецепторов недостаточно вырабатывается индуцированный прогестероном блокирующий фактор. Последний регулирует переход иммунной системы на функционирование в условиях беременности и обладает существенной антиабортивной активностью. Вследствие этого в организме не меняется баланс цитокинов, вырабатываемых Т-хелперами 1-го и 2-го типов, поддерживается высокий уровень производства провоспалительных и цитотоксических цитокинов, а также снижается защита эмбриона от деструкции его НК-клетками [9]. Недостаточное производство 5β-дигидропрогестерона в плаценте, обнаруженное нами при обострении ЦМВ-инфекции во время беременности, наряду с недостатком прогестерона, может приводить к увеличению тонуса миометрия и к неадекватному уровню кровообращения в системе «мать–плацента–плод».

Выявленные факты способствуют, по нашему мнению, созданию условий для преждевременного прерывания беременности, которое и наблюдалось при обострении ЦМВ-инфекции. Если содержание 5β-дигидропрогестерона, прогестерона и его рецептора понижается значительно, беременность заканчивалась самопроизвольным абортom.

Литература / References

1. Довжикова И.В., Луценко М.Т. Метаболизм прогестерона в плаценте (обзор литературы) // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2017. Вып. 64. С. 101–107.
Dovzhikova I.V., Lutsenko M.T. Progesterone metabolism in placenta (review) // Bulletin physiology and pathology of respiration. 2017. No. 64. P. 101–107.
2. Ивахнишина Н.М., Кожарская О.В., Островская О.В. [и др.]. Инфицированность плаценты при невынашивании беременности // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2015. Вып. 56. С. 88–93.
Ivakhnishina N.M., Kozharskaya O.V., Ostrovskaya O.V. [et al.]. Placental infection in habitual miscarriage // Bulletin physiology and pathology of respiration. 2015. No. 56. P. 88–93.
3. Лойда З., Госсрау Р., Шиблер Т. Гистохимия ферментов: лабораторные методы / пер. с англ. М.: Мир, 1982. 272 с.
Lojda Z., Gossrau R., Schiebler T.H. Enzyme histochemistry: A laboratory manual. Moscow: Mir, 1982. 272 p.
4. Луценко М.Т., Андриевская И.А., Довжикова И.В. Способ оценки нарушения импрегнации зародыша в слизистую оболочку матки на первых неделях беременности при обострении цитомегаловирусной инфекции, подавляющей содержание прогестерона вследствие снижения активности 5β-прегнен-3,20-дион-дегидрогеназы: патент № 2541187 РФ; опубл. 10.02.2015. Бюл. № 4.

- Lutsenko M.T., Andrievskaya I.A., Dovzhikova I.V. A method for assessing impairment of embryonic impregnation in the uterine lining of the uterus during the first weeks of pregnancy with an exacerbation of cytomegalovirus infection that suppresses the progesterone content due to a decrease in the activity of 5 β -pregnene-3,20-dione dehydrogenase: Patent № 2541187 RF; published 10.02.2015. Bull. No. 4.
5. Репина М.А. Прогестерон и беременность // Журнал акушерства и женских болезней. 2011. Т. LX, № 3. С. 130–135.
Repina M.A. Progesterone and pregnancy // Journal of Obstetrics and Women's Diseases. 2011. Vol. 60, No. 3. P. 130–135
6. Da Fonseca E.B., Bittar R.E., Damião R., Zugaib M. Prematurity prevention: the role of progesterone // Curr. Opin. Obstet. Gynecol. 2009. Vol. 21, No. 2. P. 142–147.
7. Graham J.D., Clarke C.L. Physiological action of progesterone in target tissues // Endocrine Reviews. 1997. Vol. 18, No. 4. P. 502–519.
8. Hill M., Pařízek A., Kancheva R., Jirásek J. E. Reduced progesterone metabolites in human late pregnancy // Physiol. Res. 2011. Vol. 60, No. 2. P. 225–241.
9. Lucenko M., Andrievskaya I., Dovzhikova I. Morphofunctional characteristics of the placenta in norm and cytomegalovirus infection pathology. NY: IMRDC, 2015. 160 p.
10. Sheehan P.M. A possible role for progesterone metabolites in human parturition // Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol. 2006. Vol. 46, No. 2. P. 159–163.

Поступила в редакцию 29.05.2018.

PROGESTERONE AND ITS 5 β -METABOLITE ARE MARKERS OF THE THREATENING COURSE OF PREGNANCY IN CYTOMEGALOVIRUS INFECTION

I.V. Dovzhikova, I.A. Andrievskaya, K.K. Petrova, M.T. Lutsenko
Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration (22 Kalinina St. Blagoveshchensk 675000 Russian Federation)
Objective. The study objective is to assess the effect of recrudescence of cytomegalovirus (CMV) infection on the content of progesterone, its receptor and metabolite 5 β -dihydroprogesterone in the early placenta in various pregnancies.

Methods. The material for the study was 60 villous chorions, 30 of them were taken during the scraping of the uterine cavity in pregnant women with spontaneous abortion onset 9–11 weeks against the background of an recrudescence of CMV infection (the main group) and 30 with medical abortions on the same period and recrudescence of the infectious process (comparison group). The control group consisted of 35 villous chorions from pregnant women with CMV infection in the latent stage, taken with medical abortions for a period of 9–11 weeks. Determination of CMV DNA, verification of type specific antibodies, avidity index, progesterone receptor content, peripheral blood progesterone and villous chorion homogenate were performed with enzyme immunoassay. The activity of 5 β -dihydroprogesterone dehydrogenase was determined by a histochemical method followed by analysis with a Scion (USA) program using a digital microscope.

Results. Recrudescence of CMV infection during pregnancy led to a decrease in progesterone production to 63.3 \pm 2.0 nmol/L in peripheral blood, to 21.5.1 \pm 2.7 nmol/L – in villous chorion, a decrease in the content of the progesterone receptor up to 14.0 \pm 0.8 nmol/L, as well as a decrease in the activity of conversion of progesterone into 5 β -dihydroprogesterone in the trophoblast at the 8–10th week of pregnancy. In the case of spontaneous abortion against the background of an Recrudescence of CMV infection, there were more pronounced disruptions in the activity of conversion of progesterone into 5 β -dihydroprogesterone, as well as a decrease in the progesterone concentration to 44.6 \pm 2.2 nmol/L in peripheral blood, to 21.5 \pm 2.7 nmol/L – in villous chorions and receptor content in the placenta - up to 11.3 \pm 0.9 nmol/L.

Conclusions. These facts, in our opinion, reveal a possible mechanism for forming a threat of premature termination of pregnancy with recrudescence of CMV infection in the first trimester of gestation.

Keywords: villous chorion, progesterone, progesterone receptor, 5 β -dihydroprogesterone

Pacific Medical Journal, 2018, No. 4, p. 20–23.

УДК 579.842.14:57.063.8:519.237.8(571.1/.5+571.6)

DOI: 10.17238/Pmj1609-1175.2018.4.23–26

Кластерный анализ популяций *Salmonella* Enteritidis, выделенных в различных регионах Сибири и Дальнего Востока

А.В. Раков¹, Н.А. Кузнецова¹, А.С. Соловьева¹, А.А. Яковлев^{1,2}

¹ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова (690087, г. Владивосток, ул. Сельская, 1),

² Тихоокеанский государственный медицинский университет (690002, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Проведен кластерный анализ основных плазмидных типов *Salmonella* Enteritidis, циркулирующих на территории Сибири и Дальнего Востока, на основе плазмидных свойств исследуемых штаммов. Выявлены кластеры микроба, соответствующие плазмидным типам. Не обнаружено различий в штаммах, выделенных в западных и восточных регионах РФ, по спектру обнаруженных в них плазмид и отношению к антибиотикам. Показано значение исследования устойчивости к налидиксовой кислоте и канамицину как значимых эпидемиологических фенотипических маркеров для *S. Enteritidis*. Подтверждена эффективность применения плазмидного анализа как метода определения популяций возбудителя. При кластерном анализе данных, полученных с помощью других методов, например, пульс-электрофореза, мультилокусного сиквенс-типирования, количественного определения чувствительности к антибиотикам и других, будут получены более точные выводы о структуре популяции *S. Enteritidis* и ее изменчивости.

Ключевые слова: сальмонеллы, плазмидный тип, кластеры

Сальмонеллезная инфекция – наиболее распространенная кишечная инфекция во всем мире [12]. Например, в США заболеваемость сальмонеллезом достигла

миллиона случаев в год, из них в 19 тыс. случаев потребовалась госпитализация и 380 закончились летальным исходом [9]. В Приморском крае на фоне существенного изменения структуры кишечной группы инфекций в сторону увеличения доли заболеваний ротавирусной и норовирусной этиологии и снижения

Раков Алексей Владимирович – канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и экологии патогенных бактерий НИИЭМ; e-mail: alexeyrakov@mail.ru

интенсивности эпидемического процесса вирусного гепатита А и шигеллезом удельный вес заболевших сальмонеллезом на протяжении последнего десятилетия оставался довольно стабильным и колебался в пределах 10% [6].

Вид *Salmonella enterica* включает в себя более 2600 серотипов, различающихся как по адаптации к различным организмам-хозяевам, так и по распространению [11]. Известно, что сальмонеллез, вызываемый серотипом *Salmonella* Enteritidis, занимает ведущее значение среди других серотипов сальмонелл во многих странах мира, в том числе и в России [2]. Установлено, что заболеваемость, инициируемая данным серотипом, обусловлена циркуляцией возбудителя среди птицы на предприятиях промышленного птицеводства, продукция которых используется в пищу [8].

Мониторинговые исследования структуры популяций *S. Enteritidis* на Дальнем Востоке и в Сибири проводятся в НИИЭМ им. Г.П. Сомова на протяжении последних 30 лет [7]. Основным методом характеристики возбудителя служит анализ плазмидной ДНК, содержащейся в штаммах микроба, позволивший разделить его популяцию на плазмидные типы, отличающиеся по своей эпидемиологической значимости [2, 7].

Одной из важнейших проблем для современного здравоохранения стало распространение резистентных к антибиотикам штаммов сальмонелл. Хотя для *S. Enteritidis* и характерна низкая доля антибиотикорезистентных штаммов по сравнению с некоторыми другими серотипами, в последние годы наблюдается тенденция к увеличению распространения штаммов с повышенной резистентностью к одному или нескольким антибиотикам [13]. Проведенные нами ранее исследования показали, что с 2003 г. в России появились штаммы *S. Enteritidis* со сниженной чувствительностью к ципрофлоксацину, одному из наиболее часто используемых в лечении антибиотиков класса фторхинолонов, и устойчивые к налидиксовой кислоте, считающейся маркером сниженной чувствительности к фторхинолонам [1].

Целью данного исследования стал анализ популяционной структуры *S. Enteritidis*, выделенных на Дальнем Востоке и Сибири из различных экологических источников, с помощью современных методов кластерного анализа.

Материалы и методы

Исследовано 345 штаммов *S. Enteritidis*, выделенных от больных и из пищевых продуктов в 1989–2018 гг. при sporadic и вспышечной заболеваемости населения. Все штаммы принадлежали к десяти доминирующим плазмидным типам (38 MDa, 38:1,4 MDa, 38:4,4 MDa, 38:30:2,3 MDa, 38:26:1,4 MDa, 38:3,0:1,4 MDa, 38:30 MDa, 38:30:1,4 MDa, 38:2,3:1,4 MDa, 38:2,6:1,4 MDa) и хранились в коллекции лаборатории молекулярной эпидемиологии и экологии патогенных бактерий НИИЭМ им. Г.П. Сомова. При этом 151 штамм был изолирован в Приморском крае, 27 – в Хабаровском крае, 11 – в Еврейской АО, 7 – в Сахалинской области,

2 – в Магаданской области, 18 – в Камчатском крае, 3 – в Чукотском АО, 1 – в Республике Саха (Якутия), 6 – в Республике Бурятия, 38 – в Иркутской области, 6 – в Томской области, 53 – в Новосибирской области, 6 – в Омской области. Кроме того, для сравнения, нами были исследованы 16 штаммов *S. Enteritidis*, выделенных в Мурманской области. Идентификацию и серотипирование сальмонелл проводили в соответствии с описанной ранее методикой [7]. Чувствительность к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом в соответствии с современными методическими указаниями [5]. Исследована чувствительность к 15 антибиотикам, относящимся к аминогликозидам (амикацин, гентамицин, канамицин, стрептомицин), цефалоспорином (цефалексин, цефуоксим, цефотаксим, цефепим), ингибиторам фолатов (сульфаметоксазол-триметоприм), пеницемам (имипенем), пеницилинам (ампициллин), амфениколам (хлорамфеникол), хинолонам (налидиксовая кислота, ципрофлоксацин) и тетрациклином (тетрациклин).

Для классификационного многомерного анализа популяций *S. Enteritidis*, содержащего генетические (состав имеющихся в штаммах плазмид) и фенотипические (антибиотикограмма) данные большого объема, применен метод кластерного анализа. В качестве дополнительных были использованы метаданные о происхождении штаммов (источник, регион и дата выделения). Для установления предполагаемого количества кластеров (популяций) – K – использовались программы Structure и Structure Harvester [10], основанные на байесовском классификаторе и служащие стандартом де-факто для непараметрического описания генетических данных. Для иерархической (Евклидово расстояние) и итеративной (методом K-средних) кластеризации использовался веб-сервис Morpheus (Институт Броуда).

Результаты исследования

Для определения количества кластеров была проведена независимая симуляция в программе Structure с предполагаемым количеством кластеров (от 2 до 15) с учетом того факта, что количество плазмидных типов в исследуемой выборке было равно десяти. Анализ полученных данных с помощью программы Structure Harvester показал, что максимальное ΔK (наиболее вероятное значение медианы) было при значениях K, равных 10, 12 и 13. Данные стратификационного анализа выявили наличие девяти четко различимых (с большим количеством примесей из других) кластеров (табл.). Обнаруженные кластеры достаточно четко определялись соответствующими плазмидными типами возбудителя. При этом максимальное значение примесей было в группе, где все штаммы относились к плазмидному типу 38 MDa, а минимальное – в кластере, соответствующему плазмидному типу 38:30:2,3 MDa. Интересно отметить, что это минимальное количество примесей у данного кластера по сравнению с остальными сохранялось вплоть до K, равному 13. Количество и состав кластеров полностью

Таблица

Соответствие исследованных плазмидных типов и кластеров, выявленных в программе Structure

Плазмидный тип (MDa)	Кол-во штаммов, абс.		
	всего штаммов	кластеры	
		K=2	K=9–13
38	96	1	1
38:3,0:1,4	55	1	2
38:1,4	29	2	3
38:2,6:1,4	19	2	4
38:30:2,3	28	2	5
38:30	28	2	6
38:30:1,4	11	2	6
38:4,4	22	2	7
38:26:1,4	30	2	8
38:2,3:1,4	27	2	9
Всего:	345	2	9

коррелировали с плазмидным типом микроба, за исключением того, что плазмидные типы 38:30:1,4 MDa и 38:30 MDa относились к одному кластеру, в котором различие между ними было крайне слабым. Интересно также отметить, что при значениях K=9–10, в отличие от K=12–13, в двух случаях наблюдалось родство между кластерами, содержащими одинаковые плазмиды. В первом случае это были кластеры, образованные плазмидными типами 38:1,4 MDa и 38:2,6:1,4 MDa, а во втором – 38:30:2,3 MDa, 38:30 MDa и 38:30:1,4 MDa.

Особую значимость представляет упорядочивание выборки на два кластера (при K=2): к первому кластеру относились плазмидные типы 38 MDa и 38:3,0:1,4 MDa, а ко второму – остальные восемь типов, что также может указывать на родство первых двух плазмидных типов.

Иерархическая кластеризация была выполнена для выявления связей между различными плазмидными типами, что указывало бы на их возможное родство. При выполнении данного анализа не было выявлено каких-либо определенных кластеров, за исключением того, что все штаммы относительно четко разделялись на две приблизительно равные группы, определяемые по устойчивости к налидиксовой кислоте. Корреляции с плазмидными типами, подобно определенной предыдущим методом, данным методом выявлено не было.

Итеративная кластеризация по методу K-средних была основана на ранее определенных значениях K, равных 10, 12 и 13, а также при K=2 для сравнения. При K=2 выборка, в зависимости от симуляции, поделилась на две группы с учетом классификаторов «устойчивость к налидиксовой кислоте» или «сниженная чувствительность к канамицину». При значениях K, равных 10, 12 и 13, четкого разделения кластеров, так же, как и при иерархической кластеризации, не наблюдалось. Дополнительное сопоставление полученных результатов с метаданными не выявило статистически значимой взаимосвязи между кластерами и источником, местом и временем выделения возбудителя.

Обсуждение полученных данных

Статистическая обработка выборки с большим количеством исследуемых показателей часто связана с проблемой выбора метода анализа данных. В последние десятилетия с накоплением большого объема, как генетической, так и фенотипической информации, с одной стороны, и увеличением вычислительной мощности компьютеров – с другой, появилось различное программное обеспечение, нацеленное на обработку и анализ разнородных данных. В нашем исследовании мы использовали кластерный анализ, как один из эффективных современных методов обработки эпидемиолого-микробиологических данных, полученных при мониторинге за возбудителем сальмонеллезной инфекции, вызванной *S. Enteritidis*.

При анализе данных программами Structure и Structure Harvester были четко выявлены девять кластеров микроба, что практически полностью соответствовали плазмидным типам, обнаруженным нами ранее [2]. Единственный кластер, состоявший из двух плазмидных типов (38:30:1,4 MDa и 38:30 MDa), может свидетельствовать в пользу того, что плазмидный тип 38:30 MDa мог возникнуть из типа 38:30:1,4 MDa, утратившего плазмиду 1,4 MDa [3]. При этом предполагаемое количество популяций (K) в одном из случаев было равно десяти, что соответствовало числу плазмидных типов. Более высокие числа K, равные 12–13, можно объяснить возможным наличием субкластеров в плазмидном типе, содержавшем единственную плазмиду вирулентности массой 38 MDa, который представляет собой различные с эволюционной точки зрения популяции полифилетической природы, и малодифференцируем при плазмидном анализе [4]. Этот факт был подтвержден при стратификации наибольшим количеством примесей по сравнению с остальными кластерами. При этом представляется затруднительным сделать вывод о количестве субкластеров в кластере, соответствующем плазмидному типу 38 MDa.

Анализ штаммов, выделенных в Мурманской области, западном регионе РФ, выявил такие же плазмидные типы микроба, как и в географически отдаленных регионах Сибири и Дальнего Востока. Соответственно, не было обнаружено различий между «западными» и «восточными» штаммами в полученных кластерах.

Хотя количество исследуемых плазмидных типов было 10, самих плазмид – 8, а исследуемых антибиотиков – 15, основной вклад в упорядочивание кластеров был внесен именно генетической (плазмидным типом), а не фенотипической (отношение к антибиотикам) характеристикой, имеющей более низкую разрешающую способность. Это также подтверждает факт, что независимо от плазмидного типа микроба, спектр их антибиотикорезистентности слабо коррелирует друг с другом.

Применение иерархических и итеративных методов кластеризации к данным о штаммах *S. Enteritidis* (плазмиды, содержащиеся в штаммах, и отношение к антибиотикам качественным методом) дало возможность

прийти к заключению, что важными классификаторами, позволяющими разделить выборку, служит резистентность к налидиксовой кислоте, как уже было показано нами ранее [1], и сниженная чувствительность к канамицину. Эти два антибиотика по отдельности или в комбинации можно рекомендовать как эпидемиологические фенотипические маркеры *S. Enteritidis*.

Таким образом, применение кластерного метода на данных плазмидного анализа и определения чувствительности к антибиотикам позволило прийти к предварительному выводу, что выявленные популяции *S. Enteritidis* соответствуют плазмидным типам, что доказывает эффективность именно плазмидного анализа. При добавлении данных, используемых при кластерном анализе, полученных с помощью других методов, например, пульс-электрофореза, мультилокусного сиквенса-типирования, количественного определения чувствительности к антибиотикам и других, будут получены более точные выводы о структуре популяции *S. Enteritidis* и ее изменчивости.

Литература / References

1. Елиусизова А.В., Шубин Ф.Н., Кузнецова Н.А., Баходдина С.И. Чувствительность к фторхинолонам сальмонелл в Сибири и на Дальнем Востоке // Тихоокеанский мед. журн. 2010. № 4. С. 51–54.
Eliusizova A.V., Shubin F.N., Kuznetsova N.A., Bakholdina S.I. Fluoroquinolone sensitivity of salmonellas in Siberia and Far East // Pacific Medical Journal, 2010. No. 4. P. 51–54.
2. Раков А.В. Молекулярная эпидемиология сальмонеллеза в Сибири и на Дальнем Востоке // Acta Biomedica Scientifica. 2007. Т. 53, № 1. С. 236–237.
Rakov A.V. Molecular epidemiology of salmonellosis in Siberia and Far East // Acta Biomedica Scientifica. 2007. Vol. 53, No. 1. P. 236–237.
3. Раков А.В., Шубин Ф.Н., Кузнецова Н.А. Гетерогенность плазмид молекулярной массой 1,4 МДа в штаммах *Salmonella Enteritidis* // Бюллетень СО РАМН. 2013. Т. 33, № 2. С. 10–15.
Rakov A.V., Shubin F.N., Kuznetsova N.A. Heterogeneity of 1.4 MDa plasmids in *Salmonella Enteritidis* strains // Bulletin SB RAMS. 2013. Vol. 33, No. 2. P. 10–15.
4. Раков А.В., Шубин Ф.Н. Сравнительный геномный анализ плазмиды вирулентности *Salmonella enterica* подвид *enterica* серотип *Enteritidis* // Генетика. 2019 (в печати).
Rakov A.V., Shubin F.N. Comparative genomics analysis of the *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype *Enteritidis* virulence plasmid // Russian Journal of Genetics. 2019 (in press).
5. Семина Н.А., Сидоренко С.В., Резван С.П. [и др.]. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам // Клини. микробиол. и антимикроб. химиотер. 2004. Т. 6, № 4. С. 306–359.
Semina N.A., Sidorenko S.V., Rezvan S.P. [et al.]. Guidelines for susceptibility testing of microorganisms to antibacterial agents // Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2004. Vol. 6, No. 4. P. 306–359.
6. Чекунина С.Н. Эпидемиологическая оценка факторов, детерминирующих эпидемический процесс гепатита А и шигеллез (на модели Приморского края): автореф. дис. ... канд. мед. наук. Омск, 2017. 20 с.
Chekunina S.N. Epidemiological assessment of the factors determining epidemic process of hepatitis A and shigellosis (on model of Primorsky Krai): Thesis of PhD. Omsk, 2017. 20 p.
7. Шубин Ф.Н., Ковальчук Н.И., Кузнецова Н.А. [и др.]. Микробиологический мониторинг за *Salmonella Enteritidis* в Приморском крае. Фенотипическая и плазмидная характеристика возбудителя // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2002. № 2. С. 36–40.
Shubin F.N., Kovalchuk N.I., Kuznetsova N.A. [et al.]. Microbiological monitoring for *Salmonella Enteritidis* in Primorye Region. Phenotypical and plasmid characterization of the pathogen // Epidemiology and Infectious Diseases. 2002. No. 1. P. 36–40.
8. Шубин Ф.Н., Раков А.В., Кузнецова Н.А. Гетерогенность популяции *Salmonella Enteritidis* на предприятиях промышленного птицеводства и ее отражение в эпизоотическом процессе // Вестник Новосибирского государственного аграрного университета. 2013. Т. 27, № 2. С. 118–121.
Shubin F.N., Rakov A.V., Kuznetsova N.A. *Salmonella Enteritidis* population heterogeneity at poultry industrial enterprises and its reflection in epizootic process // Bulletin of Novosibirsk State Agricultural University. 2013. Vol. 27, No. 2. P. 118–121.
9. CDC. An Atlas of *Salmonella* in the United States, 1968–2011. 248 p. URL: <https://www.cdc.gov/salmonella/pdf/salmonella-atlas-508c.pdf> (дата обращения 25.09.2018).
10. Earl D.A., von Holdt B.M. Structure Harvester: a website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method // Conservation Genetics Resources. 2012. Vol. 4, No. 2. P. 359–361.
11. Graziani C., Losasso C., Luzzi I. [et al.]. *Salmonella* // Foodborne diseases: Third edition. Chapter 5. 2017. Cambridge: Academic Press. P. 133–169.
12. Havelaar A.H., Kirk M.D., Torgerson P.R. [et al.]. World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010 // PLOS Medicine. 2015. Vol. 12, No. 12. P. e1001923.
13. Paudyal N., Pan H., Li X. [et al.]. Antibiotic resistance in *Salmonella Enteritidis* isolates recovered from chicken, chicken breast, and humans through National Antimicrobial Resistance Monitoring System between 1996 and 2014 // Foodborne Pathogens and Disease. 2018. Published online 3 October. URL: <https://doi.org/10.1089/fpd.2017.2402> (дата обращения 25.09.2018).

Поступила в редакцию 26.09.2018.

CLUSTER ANALYSIS OF SALMONELLA ENTERITIDIS POPULATIONS ISOLATED IN VARIOUS REGIONS OF SIBERIA AND THE FAR EAST

A.V. Rakov¹, N.A. Kuznetsova¹, A.S. Solovyeva¹, A.A. Yakovlev^{1,2}

¹ Somov Institute of Epidemiology and Microbiology (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russian Federation), ² Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 690002 Russian Federation)

Objective. *Salmonella* infection is the most common intestinal infection in the world. The goal of this study was to study the population structure of *Salmonella Enteritidis*, isolated in the Far East and Siberia from various environmental sources, using modern methods of cluster analysis.

Methods. 345 *S. Enteritidis* strains isolated from patients and from food in 1989–2018 were studied with sporadic and flare morbidity of the population belonging to the ten major plasmid types. For the classification multidimensional analysis of the results containing genetic (composition of plasmids in the strains) and phenotypic (antibiogram) data, the cluster analysis method was used.

Results. To determine the number of clusters, an independent simulation was performed with their estimated number (from 2 to 15). The data of stratification analysis revealed 9 clearly distinguishable clusters with a large number of impurities from other clusters. The detected clusters were rather clearly defined by the corresponding plasmid types of the pathogen.

Conclusions. No differences were found in the strains isolated in the western and eastern regions of the Russian Federation. The effectiveness of using plasmid analysis as a method for determining pathogen populations has been confirmed.

Keywords: *Salmonella*, plasmid type, clusters

УДК 616–002.3–022.7: 612.313.63]–078

DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2018.4.27–28

Микробиологический статус искусственных гнойно-воспалительных заболеваний мягких тканей, ассоциированных с введением ротовой жидкости

Г.Г. Мелконян^{1, 2}, А.Н. Коваль^{1, 2}, Н.В. Ташкинов², Н.В. Стрельникова², Е.Э. Васильева¹¹ 301 Военный клинический госпиталь МО РФ (680028, г. Хабаровск, ул. Серышева, 1),² Дальневосточный государственный медицинский университет (680000, г. Хабаровск, ул. Муравьева–Амурского, 35)

Проведен сравнительный анализ микробного состава раневого отделяемого при искусственных и неискусственных гнойно-воспалительных заболеваниях мягких тканей 2–4-го уровней у 80 пациентов отделения гнойной хирургии 301 ВКГ за 7-летний период. Установлено, что спектр микроорганизмов, выделенных из «искусственных очагов», характеризовался более выраженным видовым разнообразием с превалированием облигатных и факультативных анаэробных штаммов. Максимальная концентрация микроорганизмов в ране обнаруживалась при введении зубного налета.

Ключевые слова: гнойно-воспалительные заболевания мягких тканей, зубной налет, анаэробная инфекция, микробиологическая характеристика

Проблема искусственных гнойно-воспалительных заболеваний мягких тканей, развивающихся после введения собственной ротовой жидкости, остается по-прежнему актуальной, о чем свидетельствуют многочисленные публикации последних лет [1, 3, 4, 6, 7, 11, 12]. Установлено, что наиболее часто применяемыми биологическими субстратами для воспроизведения гнойного воспаления мягких тканей служат ротовая жидкость и зубной налет [1, 3, 9]. Эти нестерильные, высокообсемененные бактериями субстраты, попадая в мягкие ткани, приводят к быстрому возникновению тяжелых форм гнойной хирургической инфекции, так как процесс протекает с участием резидентных облигатных анаэробов и агрессивных микробных ассоциаций [1, 5, 8, 11, 12]. В то же время в исследованиях, посвященных данному вопросу, как правило, не рассматривается микробиологическая характеристика воспаления и не делается сравнительная оценка микробного статуса у пациентов с искусственными и неискусственными гнойно-воспалительными процессами 2–4-го уровней в мягких тканях.

Материал и методы

Исследование проводилось в отделении гнойной хирургии 301 ВКГ с 2006 по 2013 гг. Для выявления особенностей микробного статуса у пациентов с искусственными гнойно-воспалительными заболеваниями 2–4-го уровня было сформировано две группы: основная и контрольная. В основную группу вошли 40 военнослужащих по призыву, у которых данная патология была вызвана введением собственной ротовой жидкости в мягкие ткани (что было подтверждено самими больными). Контрольную группу составили 40 военнослужащих по призыву с неискусственными гнойно-воспалительными заболеваниями мягких тканей 2–4-го уровней, находившихся на лечении в том же отделении в тот же период времени (контрольная группа была сформирована методом случайной выборки).

Ташкинов Николай Владимирович – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой хирургии ФПК и ППС ДВГМУ; e-mail: tashchkinov@mail.ru

Проведен микробиологический анализ раневого отделяемого, забор которого осуществляли согласно приказу МЗ СССР от 22.04.1985 г. № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клиничко-диагностических лабораториях ЛПУ». Определение видовой принадлежности возбудителей происходило в бактериологической лаборатории диагностического центра 301 ВКГ с использованием бактериологического анализатора и классических методов исследования.

Результаты исследования

Зафиксировано значительное превышение частоты положительных результатов посевов из ран пациентов контрольной группы по сравнению с основной, что отчасти можно объяснить трудоемкостью культивирования анаэробов, а также наличием в ротовой полости некультивируемых и/или труднокультивируемых форм микроорганизмов. Вместе с тем, количество ассоциаций микроорганизмов оказалось в семь раз выше у пациентов с искусственными гнойно-воспалительными заболеваниями мягких тканей. Облигатные и факультативные анаэробные штаммы выделялись из ран больных основной группы значительно чаще, чем в контроле (табл.).

Обсуждение полученных данных

В полости рта обитает около 600–800 видов микроорганизмов, три четверти из которых представлены анаэробами [11]. Максимальная концентрация микроорганизмов (10^{10} – 10^{12}) обнаруживается в зубном налете, который отличается наибольшим видовым разнообразием [1, 9] и структурирован в виде биопленок, что в сочетании с десневой жидкостью можно считать дополнительным фактором вирулентности [2]. Представленные данные отражают уровень потенциальной опасности для жизни при умышленном искусственном инфицировании и дальнейшем развитии гнойного воспаления с участием оральной микрофлоры, которая,

Таблица

Микробный статус раневого отделяемого у пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями мягких тканей

Результат бактериологического исследования	Кол-во наблюдений с группам			
	Основная		Контроль	
	абс.	%	абс.	%
Положительный	19	47,5	33	82,5
Ассоциации микробов	7	17,5	1	2,5
Клинически значимые штаммы аэробов				
<i>Pseudomonas</i> spp.	3	15,7	3	9,0
Клинически значимые штаммы факультативных анаэробов				
<i>Staphylococcus</i> spp.	17	89,4	27	81,8
<i>Streptococcus</i> spp.	7	36,8	16	48,4
Сем. Enterobacteriaceae	7	36,8	5	15,1
<i>Enterococcus</i> spp.	6	31,5	–	–
<i>Listeria</i> spp.	1	5,3	–	–
Клинически значимые штаммы облигатных анаэробов				
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	13	23,6	6	14,8
<i>Bacteroides</i> spp.	6	31,5	4	12,1
<i>Fusobacterium</i> spp.	6	31,5	2	6,0
<i>Clostridium</i> spp.	2	10,5	–	–
<i>Veillonella</i> spp.	2	10,5	–	–
<i>Lactobacillus</i> spp.	2	10,5	–	–
<i>Prevotella</i> spp.	1	5,3	–	–

Примечание. Суммы в столбцах превышают 100% в связи с выделением нескольких видов бактерий от одного пациента. Процент рассчитан от количества положительных результатов бак. исследования.

попадая в неестественные условия обитания, проявляет высокую агрессивность.

Спектр микроорганизмов, выделенных из ран пациентов с искусственными гнойно-воспалительными заболеваниями мягких тканей, характеризовался выраженным видовым разнообразием. Облигатные и факультативные анаэробы здесь определялись значительно чаще, чем при неестественных патологических процессах, что позволяет рекомендовать для эмпирической терапии искусственных гнойно-воспалительных заболеваний мягких тканей антибактериальные химиопрепараты, действующие на анаэробную микрофлору.

Литература / References

- Бурлова Т.В. Патомимия в клинике гнойной хирургии: дис. ... канд. мед. наук. М., 1998. 121 с.
Burlova T.V. Pathomimia in the clinical picture of purulent surgical cases: Thesis ... of MD. Moscow, 1998. 121 p.
- Зеленова Е.Г. Микрофлора полости рта: норма и патология: учебное пособие. Н. Новгород: Изд-во НГМА, 2004. 158 с.
Zelenova E.G. Microflora of oral cavity: norm and pathology: A study guide. Nizhny Novgorod: NSMA Publishing House, 2004. 158 p.
- Коваль А.Н., Ташкинов Н.В., Мелконян Г.Г. [и др.]. О классификации и формулировке диагноза искусственных заболеваний в хирургии // Дальневосточный медицинский журнал. 2017. № 1. С. 33–37.
Koval A.N., Tashkinov N.V., Melkonyan G.G. [et al.]. On the classification and formulation of diagnosis of fastitious disease in surgery // Far Eastern Medical Journal. 2017. No. 1. P. 33–37.
- Мелконян Г.Г., Коваль А.Н., Ташкинов Н.В., Куликова Н.А. Клинические особенности искусственных гнойно-воспалительных заболеваний мягких тканей, инициированных наиболее часто применяемыми нестерильными биологическими жидкостями // Дальневосточный медицинский журнал. 2017. № 2. С. 68–71.
Melkonyan G.G., Koval A.N., Tashkinov N.V., Kulikova N.A. Clinical peculiarities of artificial pyoinflammatory diseases of soft tissues most often caused by the application of non-sterile body fluids // Far Eastern Medical Journal. 2017. No. 2. P. 68–71.
- Раны и раневая инфекция: руководство для врачей / под ред. М.И. Кузина, Б.М. Костюченко. М.: Медицина, 1990. 591 с.
Wounds and wound infection: A guide for physicians / Ed. by M.I. Kuzin, B.M. Kostyuchenok. Moscow: Medicine, 1990. 591 p.
- Светухин А.М. Клиническое значение ранней диагностики анаэробной неклостридиальной инфекции // Хирургия. 2005. № 8. С. 41–44.
Svetukhin A.M. Clinical significance of early diagnosis of anaerobic non-clostridial infection // Surgery. 2005. No. 8. P. 41–44.
- Французов В.Н. Сепсис у больных анаэробной неклостридиальной инфекцией мягких тканей. Диагностика, лечение и организация специализированной медицинской помощи: дисс. ... д-ра мед. наук. М., 2008. 226 с.
Frantsuzov V.N. Sepsis in patients with anaerobic non-clostridial infection of soft tissues. Diagnosis, treatment and organization of specialized medical care: Thesis ... a Doctor of Medical Sciences. Moscow, 2008. 226 p.
- Хирургическая инфекция / Н.П. Безлуда [и др.]; под ред. Я.Л. Заруцкого. УВМА, ГВМКЦ «ГВКГ». Киев: [б.и.], 2009. 296 с.
Surgical infection / N.P. Bezluda [et al.]; ed. by I.L. Zarutskii; UBMA, GBMKT "GBKG". Kiev, 2009. 296 p.
- Aas J.A. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity // J. Clin. Microbiol. 2005. Vol. 43. P. 5721–5732.
- Poveda-Roda R. Bacteremia originating in the oral cavity: A review // Med. Oral. Pathol. Oral. Cir. Bucal. 2008. Vol. 13, No. 6. P. 355–362.
- Werden F. The phenomenon of covert self-mutilation in the surgical routine // Chirur. 2016. Vol. 87, No. 21. P. 29–35.
- Ahrenholz D.H. Necrotizing fasciitis and other infections: Intensive Care Medicine, 2nd ed. Boston: Little Brown, 1991. 1334 p.

Поступила в редакцию 31.01.2018.

MICROBIOLOGICAL STATUS OF ARTIFICIAL PYOINFLAMMATORY DISEASES OF SOFT TISSUES ASSOCIATED WITH INTRODUCTION OF ORAL FLUID

G.G. Melkonyan^{1,2}, A.N. Koval^{1,2}, N.V. Tashkinov², N.V. Strelnikova², E.E. Vasilyeva¹

¹ Military Clinical Hospital No. 301 of the Russian Federation Ministry of Defense (1 Serysheva St. Khabarovsk 680028 Russian Federation), ² Far Eastern State Medical University (35 Muravyeva-Amurskogo St. Khabarovsk 680000 Russian Federation)

Objective. The study of microbial status of artificial pyoinflammatory diseases of soft tissues developed after introduction of patient's own oral fluid.

Methods. Comparative 7-year analysis of the microbial composition of wound discharge in artificial pyoinflammatory diseases of soft tissues and inartificial pyoinflammatory diseases of soft tissues of 2nd to 4th levels has been carried out in 80 patients of the Purulent surgery department of Military Clinical Hospital No. 301.

Results. It has been determined that microbes revealed in artificial pyoinflammatory diseases of soft tissues showed a more pronounced diversity with the prevalence of obligate and facultative anaerobic strains compared to the 2nd to 4th levels of pyoinflammatory diseases of soft tissues. Maximum concentration of microbes was found in dental plaque, which distinguish features are wide diversity of microbes and high level of their virulence.

Conclusions. The obtained results of the microbial status of patients with artificial pyoinflammatory diseases of soft tissues make it possible to recommend the use of the empiric treatment of such patients with antimicrobial chemotherapeutic agents affecting the anaerobic microflora.

Keywords: pyoinflammatory diseases of soft tissues, dental plaque, anaerobic infection, microbiological characteristic

УДК 618.36-002-06:616.9]-076:611.013.84

DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2018.4.29-33

Морфометрическая характеристика терминальных ворсин при инфицировании плаценты возбудителями внутриутробных инфекций

О.В. Островская¹, О.В. Кожарская², С.В. Супрун¹, Д.В. Мусатов², В.Г. Обухова²,
Н.М. Ивахнишина¹, Е.Б. Наговицына¹, М.А. Власова¹, О.А. Лебедько¹

¹ НИИ охраны материнства и детства – филиал Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания (680022, г. Хабаровск, ул. Воронежская, 49, корп. 1), ² Перинатальный центр (680028, г. Хабаровск, ул. Истомина, 85)

Проведено молекулярно-генетическое, гистологическое и морфометрическое исследование 34 плацент после преждевременных родов. В 55,9% плацент выявлен геном возбудителей внутриутробных инфекций (*Ureaplasma* spp., *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Streptococcus agalactiae*, *Cytomegalovirus*, *Herpes human virus 4* типа). Воспалительные процессы (плацентит, хориоамнионит, децидуит, виллузит) определены в инфицированных плацентах в 89,5% случаев. Морфометрические параметры терминальных ворсин инфицированных плацент отличались выраженностью признаков гипоксии, а также компенсаторно-приспособительными реакциями, направленными на расширение площади газообмена и улучшение жизнеспособности плода.

Ключевые слова: плацента, внутриутробная инфекция, преждевременные роды, морфометрия ворсин

Внутриутробные инфекции остаются важнейшей медико-социальной проблемой акушерства и перинатологии. Они влияют на показатели неонатальной и младенческой заболеваемости и смертности, входят в число наиболее значимых этиологических факторов антенатальной патологии, вызывают невынашивание беременности, мертворождение, рождение маловесных детей и детей с признаками врожденной инфекции и неврологическими нарушениями в постнатальном периоде. При любом пути заражения в случае развития внутриутробной инфекции у плода закономерно поражается плацента. Внутриутробное инфицирование плаценты сопровождается диссоциированным развитием ворсинчатого хориона, склеротическими, воспалительными, компенсаторно-приспособительными изменениями во всех отделах плаценты и плодных оболочек [1].

Механизмы индуцированных бактериями и вирусами повреждений плаценты плохо изучены, и это затрудняет разработку стратегий клинического ведения и потенциальной терапии для поддержки развития плаценты, улучшения течения и исходов беременности [14]. Наиболее значимым фактором патогенеза считается нарушение строения терминальных ворсин, которым принадлежит ведущая роль в обмене между кровью матери и плода. В терминальные ворсины входят капиллярные клубочки, состоящие из 2–4 сосудистых петель, которые на разрезе представлены соответствующим количеством капиллярных просветов, окруженных истонченным хориальным синцитием. Качественная и количественная оценка терминальных ворсин служит одним из диагностических критериев полноценности функции плаценты [2]

Анализу морфометрических параметров терминальных ворсин при внутриутробном инфицировании посвящены работы ряда авторов. Так, М.Т. Луценко и А.А. Андриевская [4] показали, что при беременности, осложненной активизацией герпетической или цитомегаловирусной инфекции, происходит выраженная перестройка кровеносного русла терминальных ворсин, увеличивается расстояние между кровеносными сосудами и внутренней поверхностью синцитиотрофобласта. Это приводит к недостаточности газообмена во время беременности, гипоксии и подтверждается измерением концентрации кислорода в крови матери и в пуповинной крови во время родов.

L. Pereira et al. [14] установили, что в клинических случаях врожденной цитомегалии вирус заражает клетки-предшественники трофобласта, таким образом уменьшается их популяция, способность к самообновлению, миграции и дифференциации, тем самым снижается число транспортных синцитиотрофобластов и инвазивных цитотрофобластов, образующих ворсинки хориона – функциональные единицы плаценты.

По мнению С.К. Kim et al. [13], воспалительный процесс неизвестной этиологии в хориальных ворсинах ассоциируется с преждевременными родами, задержкой внутриутробного развития, преэклампсией и гибелью плода. G. Bae et al. [11] обнаружили нейтрофильную инфильтрацию в ворсинах хориона, выявили *Streptococcus agalactiae* в сосудах ворсин и в пробах внутренних органов при аутопсийном исследовании внутриутробно погибшего плода. Авторы заключили, что острый виллузит, этиологически связанный с *S. agalactiae*, стал причиной сепсиса в антенатальном периоде и привел к внутриутробной гибели плода. L.B. de Freitas et al. [12] выявили вирус папилломы человека 11, 58, 66 и 82-го типов в фрагментах децидуальной ткани и хорионических ворсинок при ранних спонтанных выкидышах. Авторы обсуждали возможность

Островская Ольга Васильевна – д-р мед. наук, в.н.с., руководитель группы молекулярно-генетической диагностики лаборатории комплексных методов исследования бронхо-легочной и перинатальной патологии НИИ ОМиД; e-mail: olrom41@mail.ru

причинно-следственной связи между вирусом папилломы человека и спонтанными выкидышами.

Предпринятое нами ранее изучение инфицированности плацент при невынашивании беременности установило наличие генома перинатально-значимых инфекций в 62,8% случаев. Наиболее часто определялись ДНК *Streptococcus* spp., *Ureaplasma urealyticum* и *Cytomegalovirus* [3].

Цель настоящего исследования – морфометрическая характеристика терминальных ворсин при инфицировании плацент от преждевременных родов возбудителями перинатально-значимых инфекций.

Материал и методы

Работу проводили на базах Хабаровского филиала ДНЦ ФПД – НИИ Омид и патологоанатомического отделения КГБУЗ «Перинатальный центр». Объектом исследования стали 34 плаценты, полученные от женщин, беременность которых завершилась преждевременно на сроке гестации 30–36 недель. Осуществлено макроскопическое, гистологическое и морфометрическое исследование. После макроскопического изучения последов из плодовой зоны плаценты вырезали фрагменты ткани, которые фиксировали в 10% нейтральном формалине. Гистологическое исследование выполняли на парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. Морфометрию осуществляли при помощи системы анализа изображения на микроскопе Carl Zeiss с использованием программы Axio Imager. На фотографии микропрепарата плаценты просматривали 5–12 полей зрения с терминальными и, частично, с промежуточными ворсинами. С помощью программного обеспечения производили подсчет ворсин в каждом поле зрения, определяли их площадь, периметр, горизонтальный и вертикальный размеры, подсчитывали количество капилляров и измеряли расстояние от них до синцитиотрофобласта.

Из образцов нефиксированного последа брали пробы плацентарной ткани с хориальной пластины и методом полимеразной цепной реакции выявляли в них геном следующих возбудителей: *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma species* (*Ureaplasma urealyticum* плюс *Ureaplasma parvum*), *Cytomegalovirus*, *Herpes simplex virus*, *Herpes human virus* 4 типа, *Herpes human virus* 6 типа, *Chlamydia trachomatis*, *Parvovirus B19*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus* spp., *Streptococcus pyogenes*, *S. agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*. Работу осуществляли с помощью набора реагентов, разработанных в ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора и ООО «Лаборатория Изоген» (г. Москва). Для индикации нуклеиновых кислот применили «Способ выявления возбудителей внутриутробных инфекций в аутопсийном материале от погибших плодов и новорожденных», разработанный нами совместно с сотрудниками ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора [5].

Данные морфологического исследования плацент, инфицированных возбудителями перинатально-значимых инфекций, сравнивали со средними значениями параметров неинфицированных плацент. Плацентарно-плодовый коэффициент (ППК) вычисляли по таблице согласно А.М. Чарному и др. [8]. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Statistica 10. Результаты морфометрии оценивали с вычислением средних величин и ошибки средней ($M \pm m$), применяли критерий достоверности Стьюдента.

Результаты исследования

Молекулярно-генетическое исследование плацент выявило наличие геномов перинатально-значимых инфекций в 19 случаях из 34 (55,9%). Это были преимущественно микоплазмы, а также герпес-вирусы и стрептококк. *Ureaplasma* spp. в составе моно- и смешанных инфекций определена в 32,3%, *M. hominis* – в 23,5% случаев. В единичных наблюдениях обнаружены *M. genitalium*, *S. agalactiae*, *Cytomegalovirus* и *Herpes human virus* 4 типа. Других искомым инфекционных агентов не выявлено (табл. 1).

Средняя масса инфицированной плаценты (группа А, n=19) составила $363,0 \pm 43,1$ г, неинфицированной (группа Б, n=15) – $386,4 \pm 42,5$ г. ($p > 0,05$). По данным Г.А. Уелиной и А.Н. Рымашевского [7], средняя масса последа доношенного плода – 510 ± 33 г. Несоответствие степени созревания ворсинчатого дерева сроку гестации (уменьшение числа терминальных ворсин, патологическая незрелость, диссоциированное созревание, преобладание промежуточных незрелых дифференцированных ворсин или

Таблица 1

Возбудители перинатально-значимых инфекций, выявленные в 34 плацентах при недоношенной беременности

Возбудители*	Кол-во наблюдений, абс.
Моноинфекции	11
<i>Ureaplasma</i> spp.	6
<i>M. hominis</i>	2
<i>M. genitalium</i>	1
<i>S. agalactiae</i>	1
HHV-4	1
Смешанные инфекции	8
<i>Ureaplasma</i> spp.+ <i>M. hominis</i>	1
<i>Ureaplasma</i> spp.+ <i>M. hominis</i> +CMV+HHV-4	2
<i>Ureaplasma</i> spp.+ <i>M. hominis</i> + <i>S. agalactiae</i>	1
<i>M. hominis</i> + <i>S. agalactiae</i>	1
<i>M. hominis</i> +HHV-4	1
<i>M. genitalium</i> + <i>S. agalactiae</i>	1
<i>S. agalactiae</i> +HHV-4	1

* HHV-4 – *Herpes human virus* 4 типа, CMV – *Cytomegalovirus*.

Таблица 2
Воспалительные изменения в последах при недоношенной беременности

Патологический процесс	Частота регистрации			
	Группа А		Группа Б	
	абс.	%	абс.	%
Плацентит	4	21,1	–	–
Хориоамнионит	12	63,2	4	26,6
Децидуит	7	36,8	4	26,6
Виллузит	2	10,5	–	–
НМПК*	13	68,4	4	26,6
Мембранит	8	42,1	4	26,6
Виллузит и интервэллизит	4	21,1	–	–

Примечание: выделены ячейки с показателями, имеющими межгрупповую статистическую значимость разности ($p < 0,05$).

* Нарушения маточно-плацентарного кровообращения.

хаотичных склерозированных ворсин, нарушение ветвления) определено в группе А в 57,9 % случаев и в группе Б – в 60 % случаев. Такие изменения приводят к снижению диффузионной способности плаценты, способствуют замедлению роста плода и снижению массы основных органов с развитием хронической внутриутробной гипоксии с дефицитом массы тела. Вычисление ППК показало наличие гипоплазии плаценты как в группе А (36,8 %), так и в группе Б с частотой 36,8 и 26,6 %, соответственно ($p > 0,05$). Внутриутробная гипоксия сопровождается развитием компенсаторно-приспособительных реакций, в некоторых случаях приводящих к гиперплазии, которая была установлена в 21,1 % случаев в группе А и в 13,3 % случаев – в группе Б ($p > 0,05$).

Компенсаторно-приспособительные реакции (васкуляризация ворсин, синцитиокапиллярные мембраны, ангиоматоз), выраженные инволютивно-дистрофические изменения (фибриноидные некрозы, отложение фибрина, псевдоинфаркты, кальцификаты), а также аномалии развития (краевое и оболочечное прикрепление пуповины, аномалия формы плаценты – ободок, приращение, перетяжки, ангиома) также определялись в обеих группах без статистически достоверной разницы показателей. В обеих группах синцитиальный покров ворсин был истончен. Отмечалось отсутствие ворсинчатого трофобласта и наличие компенсаторного ангиоматоза с расширением просвета капилляров. Ангиоматоз незрелых ворсинок сопровождался геморрагическими нарушениями в виде тромбоза межворсинчатого пространства и инфарктов ворсинчатого дерева, острой плацентарной недостаточности. В группе А признаки острой плацентарной недостаточности найдены в 52,6 %, в группе Б – в 26,7 % случаев ($p > 0,05$).

В большинстве терминальных ворсин выявлены признаки незрелости и нефункциональности, сближенные ворсины или так называемые «афункцио-

нальные зоны», которые не омываются материнской кровью, в результате чего развивается гипоксия плода, нарушается гемостаз, возникают тромбы и кровоизлияния в межворсинчатом пространстве и оболочках, ишемические инфаркты. Признаки хронической плацентарной недостаточности установлены в 92,3 % случаев в группе А, и в 73,3 % – в группе Б ($p > 0,05$).

Инфекционно-воспалительные изменения достоверно чаще определялись в группе А. Лейкоцитарный плацентит и виллузит были обнаружены только в группе А. Частота выявления хориоамнионита в этой группе была в 2,4 раза выше, чем в группе В. Нарушения маточно-плацентарного кровообращения (кровоизлияния в межворсинчатом пространстве и оболочках, парез сосудов), которые также ассоциируются с внутриутробными инфекциями [6], в группе А встречались в 2,6 раза чаще, чем в группе Б (табл. 2).

В целом в группе А в 17 плацентах из 19 (89,5 %) обнаружены различные проявления инфекционно-воспалительных процессов, что достоверно значимо превышало этот показатель в группе Б (26,7 %). Проявления маркеров восходящего пути распространения инфекционного агента (хориоамнионит и децидуит) определялись чаще, чем изменения, характерные для гематогенного пути инфицирования (виллузит). Молекулярно-генетическое исследование также подтвердило преимущественное выявление в последах инфекционных агентов, передающихся восходящим путем.

Морфометрические параметры 8 плацент, инфицированных микоплазмами, сопоставили с параметрами 13 неинфицированных плацент (контроль). В терминальных ворсинах последов, инфицированных *M. hominis*, установлено достоверное уменьшение содержания сосудов и увеличение расстояния между кровью матери и плода. Это указывало на снижение газообмена и развивающуюся гипоксию. Известно, что при плацентарной гипоксии снижается показатель васкуляризации ворсин [9]. Чем плацента более зрелая, тем больше сосудов в терминальных ворсинах, и тем меньше расстояние между сосудистой стенкой и синцитиотрофобластом [10]. Увеличение площади поперечного сечения и периметра терминальных ворсин в плацентах, инфицированных *M. hominis*, можно рассматривать, как компенсаторную реакцию, которая способствует расширению газообмена между кровью матери и плода и обеспечивает жизнеспособность последнего. Параметры плаценты, инфицированной *M. genitalium*, также отличались от показателей группы сравнения: достоверное снижение площади, вертикального размера, периметра, а также количества капилляров в терминальных ворсинках. Эти факты можно рассматривать как признак снижения интенсивности газообмена и низкой степени компенсаторных реакций. В плацентах,

Таблица 3

Морфометрические параметры терминальных ворсин в плацентах, инфицированных микоплазмами

Морфометрический параметр	Показатель, М±m			
	Контроль (n=13)	<i>M. hominis</i> (n=2)	<i>M. genitalium</i> (n=1)	<i>Ureaplasma</i> spp. (n=5)
Площадь, мкм ²	2865,7±161,1	3860,0±612,7	1709,1±528,5	3134,6±357,6
Вертикальный размер, мкм	59,4±1,7	69,0±5,6	41,5±5,5	57,6±3,1
Горизонтальный размер, мкм	61,0±1,8	69,6±5,9	48,1±5,8	63,4±3,4
Периметр, мкм	207,5±6,3	253,9±26,5	148,9±18,9	207,1±12,4
Кол-во сосудов, абс.	4,6±0,1	3,5±0,3	2,9±0,2	4,4±0,2
Расстояние С-СТБ*, мкм	1,7±0,04	2,7±0,2	1,9±0,2	2,0±0,1

Примечание: выделены ячейки со значениями, статистически значимо отличающимися от группы сравнения (контроль).

* От сосудов (С) до синцитиотрофобласта (СТБ).

Таблица 4

Морфометрические параметры терминальных ворсин в плацентах, инфицированных различными инфекционными агентами

Морфометрический параметр	Показатель, М±m**		
	<i>S. agalactiae</i> (n=2)	HHV-4 (n=1)	Mix (n=7)
Площадь, мкм ²	1392,1±166,3	1601,4±177,6	2688,8±208,9
Вертикальный размер, мкм	45,7±3,2	49,2±3,4	59,3±2,3
Горизонтальный размер, мкм	41,0±2,7	48,6±3,7	94,0±7,5
Периметр, мкм	150,1±10,6	161,0±11,4	568,7±45,7
Кол-во сосудов, абс.	4,5±0,2	5,1±0,3	3,8±0,1
Расстояние С-СТБ*, мкм	1,2±0,1	1,8±0,1	2,0±0,1

Примечание: выделены ячейки со значениями, статистически значимо отличающимися от группы сравнения (контроль) – см. табл. 3.

* От сосудов (С) до синцитиотрофобласта (СТБ).

** HHV-4 – *Herpes human virus* 4 типа, Mix – смешанные инфекции (см. табл. 1).

инфицированных *Ureaplasma* spp., расстояние сосудов от синцитиотрофобласта было достоверно больше, чем в неинфицированных, что также свидетельствовало о снижении газообмена (табл. 3).

В плацентах, инфицированных *S. agalactiae*, площадь, вертикальный и горизонтальный размеры, периметр ворсинок и расстояние сосудов от синцитиотрофобласта было достоверно меньше, чем в группе сравнения (контроле). Такие же особенности выявлены в плаценте, инфицированной вирусом герпеса 4 типа: размеры ворсинок были достоверно меньше по сравнению с неинфицированными плацентами. Вероятно, это было связано с гипоплазией последа, что подтверждается подсчетом ППК. В данных случаях беременность прерывалась на 30–32-й неделе гестации, и ППК колебался от 0,10 до 0,12. Согласно А.М. Чарному и др. [8], ППК на этом сроке гестации должен составлять 0,21–0,23. При смешанном инфицировании определялись маркеры сниженного газообмена (уменьшенное количество капилляров в ворсинках и увеличенное расстояние сосудов от синцитиотрофобласта) и компенсаторные реакции: увеличение горизонтального размера и периметра ворсинок (табл. 4).

Обсуждение полученных данных

Морфометрические параметры терминальных ворсин в плацентах, инфицированных микоплазмами, стрептококком, вирусом герпеса 4 типа или сочетанием инфекционных агентов имеют ряд отличий от средних значений показателей ворсин неинфицированных плацент. Отличия указывают на большую выраженность гипоксии и компенсаторно-приспособительных реакций в терминальных ворсинах инфицированных плацент. Использование морфометрической характеристики терминальных ворсин в научных, патолого-анатомических и судебно-медицинских исследованиях могут способствовать раскрытию механизмов патогенеза внутриутробного поражения плаценты, совершенствованию диагностики внутриутробных инфекций, и прогнозированию состояния новорожденного.

Выводы

1. В 55,9 % плацент при преждевременных родах выявлены геномы перинатально-значимых инфекций, в том числе ДНК *Ureaplasma* spp. (32,3 % случаев) и ДНК *M. hominis* (в 23,5 % случаев). В единичных наблюдениях определены ДНК *M. genitalium*, *S. agalactiae*, *Cytomegalovirus*, *Herpes human virus* 4 типа.
2. В инфицированных плацентах воспалительные процессы диагностировались в 89,5 % случаев – достоверно чаще, чем в неинфицированных плацентах (26,7 % случаев).
3. Морфометрические параметры терминальных ворсин в инфицированных плацентах имеют ряд отличий от средних значений аналогичных показателей неинфицированных плацент:
 - а) уменьшение содержания сосудов в терминальных ворсинах и увеличение расстояния от сосудов до синцитиотрофобласта, указывающие на снижение интенсивности газообмена и развивающуюся гипоксию;

- б) увеличение площади, вертикального и горизонтального размеров, периметра ворсин – компенсаторно-приспособительные реакции, направленные на расширение площади газообмена и повышение жизнеспособности плода;
- в) уменьшение размеров терминальных ворсин (как при гипоплазии плаценты), приводящее к снижению интенсивности газообмена и гипоксии плода.
4. Выявленные особенности васкуляризации терминальных ворсин инфицированных плацент служат важным звеном патогенеза невынашивания беременности.

Литература / References

1. Булгаевич Т.Б., Кулаев И.А., Брюхина Е.В. Морфологические особенности плаценты при внутриутробном инфицировании // Пульмонология. 2008. № 13. С. 128–132. Bulgacevich T.B., Kulaev I.A., Bryukhina E.V. Placental morphology specifics in intrauterine infection // Pulmonology. 2008. No. 13. P. 128–132.
2. Дятлова Л.И., Герасимов В.Н. Особенности ультраструктуры маточно-плацентарной области при беременности, осложненной хориоамнионитом // Health and Education Millennium. 2016. Т. 1, № 2. С. 181–188. Dyatlova L.I., Gerasimov V.N. Ultrastructural specifics of uterine-placental region in pregnancy complicated by chorioamnionitis // Health and Education Millennium. 2016. Vol. 1, No. 2. P. 181–188.
3. Ивахнишина Н.М., Кожарская О.В., Островская О.В. [и др.]. Инфицированность плаценты при невынашивании беременности // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2015. № 56. С. 88–93. Ivahnishina N.M., Kozharskaya O.V., Ostrovskaya O.V. [et al.]. Placental infection in habitual miscarriage // Bulletin FPD. 2015. No. 56. P. 88–93.
4. Луценко М.Т., Андриевская И.А. Морфометрические исследования фетоплацентарного барьера ворсинок плаценты при герпетической и цитомегаловирусной инфекциях // Бюллетень СО РАМН. 2010. Т. 30, № 3. С. 137–140. Lutsenko M.T., Andrievskaya I.A. Morphometric researches fetoplacental of the barrier of villus of the placenta at herpes and cytomegalovirus infections // The Bulletin of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences. 2010. Vol. 30, No. 3. P. 137–140.
5. Островская О.В., Ивахнишина Н.М., Власова М.А. [и др.]. Способ выявления возбудителей внутриутробных инфекций в аутопсийном материале от погибших плодов и новорожденных: методические рекомендации. Хабаровск: Арно, 2012. 23 с. Ostrovskaya O.V., Ivahnishina N.M., Vlasova M.A. [et al.]. Method to detect intrauterine infectious agents in autopsy material of lost fetuses and newborns: Recommended methods. Khabarovsk: Arno, 2012. 23 p.
6. Тютюнник В.Л. Прегавидарная подготовка, тактика ведения беременности, родов и послеродового периода при инфекции // Акушерство и гинекология. 2004. № 3. С. 54–57. Tyutunnik V.L. Prepregnancy care, management of pregnancy, labor and postpartum period in infections // Obstetrics and Gynecology. 2004. No. 3. P. 54–57.
7. Уелина Г.А., Рымашевский А.Н. Морфологические и микробиологические параллели путей инфицирования последа при антенатальной гибели плода // Современные проблемы науки и образования. 2012. № 6. С. 252–258. Uelina G.A., Rymashevskiy A.N. Morphological and microbiological correlation of afterbirth infection pathways in antenatal fetal death // Modern Problems of Science and Education. 2012. No. 6. P. 252–258.
8. Чарный А.М., Кириченко А.К., Базина М.И. Патологоанатомическая диагностика заболеваний последа: методические рекомендации. М., 2001. 18 с. Charnyy A.M., Kirichenko A.K., Bazina M.I. Diagnostic pathology of afterbirth diseases: Recommended methods. Moscow, 2001. 18 p.

9. Щеголев А.И., Дубова Е.А., Павлов К.А. [и др.]. Морфометрическая характеристика терминальных ворсин плаценты при преэклампсии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2012. Т. 154, № 7. С. 104–107. Schegolev A.I., Dubova E.A., Pavlov K.A. [et al.]. Morphological description of placental terminal villi in preeclampsia // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2012. Vol. 154, No. 7. P. 104–107.
10. Щеголев А.И., Ляпин В.М., Туманова У.Н. [и др.]. Гистологические изменения плаценты и васкуляризация ее ворсин при ранней и поздней преэклампсии // Архив патологии. 2016. №1. С. 13–19. Schegolev A.I., Lyapin V.M., Tumanova U.N. [et al.]. Histological changes in the placenta and vascularization of its villi in early- and late-onset preeclampsia // Archive of Pathology. 2016. No. 1. P. 13–19.
11. Bae G.E., Yoon N., Choi M. [et al.]. Acute placental villinitis as evidence of fetal sepsis: An autopsy case report // Pediatr. Dev. Pathol. 2016. Vol. 19, No. 2. P. 165–168.
12. De Freitas L.B., Pereira C.C., Mercon-de-Vargas P.R., Spano L.C. Human papillomavirus in foetal and maternal tissues from miscarriage cases // J. Obstet. Gynaecol. 2018. Vol. 8. doi: 10.1080/01443615.2018.1454408.
13. Kim C.J., Romero R., Chaemsaithong P., Kim J.S. Chronic inflammation of the placenta: definition, classification, pathogenesis, and clinical significance // Am. J. Obstet. Gynecol. 2015. Vol. 213 (4 Suppl). doi:10.1016/j.ajog.2015.08.041.
14. Pereira L., Tabata T., Pettitt M., Fang-Hoover J. Congenital cytomegalovirus infection undermines early development and functions of the human placenta // Placenta. 2017. Vol. 59, No. 1. doi:10.1016/j.placenta. 2017.04.020.

Поступила в редакцию 06.09.2018.

MORPHOMETRIC CHARACTERISTICS OF ACROTERIC VILLI IN CASE OF PLACENTA INFECTION BY PATHOGENS OF INTRAUTERINE INFECTIONS

O.V. Ostrovskaya¹, O.V. Kozharskaya², S.V. Suprun¹, D.V. Musatov², V.G. Obuhova², N.M. Ivakhnishina¹, E.B. Nagovitsina¹, M.A. Vlasova¹, O.A. Lebed'ko¹

¹ Research Institute of Mother and Child Health Care – Khabarovsk Branch of Far Eastern Research Center of Respiratory Physiology and Pathology (49/1 Voronezhskaya St. Khabarovsk 680022 Russian Federation), ² Perinatal Center (85 Istomina St. Khabarovsk 680028 Russian Federation)

Objective. The study objective is the morphometric characterization of acroteric villi in the infection of placenta from premature births with pathogens of prenatally significant infections.

Methods. 34 placentas were studied after premature birth. A molecular genetic analysis was conducted; a histological and morphometric study was performed. The villi were counted in each field of view, their area, perimeter, horizontal and vertical dimensions, number of capillaries and their distance to syncytiotrophoblast were measured.

Results. In 55.9% placenta, genomes of intrauterine infections have been identified, including the DNA of *Ureaplasma* spp., *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Streptococcus agalactiae*, *Cytomegalovirus*, *Herpes human virus* type 4. In infected placentas, inflammatory processes (placenta, chorioamnionitis, deciduit, villusitis) are defined in 89.5% of cases. Morphometric parameters of acroteric villus infected placenta were characterized by a decrease in vascular content and an increase in the distance of the vessels from syncytiotrophoblast (which indicated a decrease in gas exchange and developing hypoxia), as well as an increase in compensatory-adaptive reactions aimed at expanding the gas exchange area and improving the viability of the fetus.

Conclusion. The use of morphometric characteristics of acroteric villi facilitates the discovery of mechanisms for the pathogenesis of intrauterine placenta damage and the formation of miscarriages, improving the prognosis of the newborn's condition.

Keywords: placenta, intrauterine infection, premature delivery, morphology of villi

УДК 616.834–002.152:612.017.1

DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2018.4.34–37

Особенности интерферонов статуса у пациентов с опоясывающим герпесом

С.В. Кныш, В.А. Малков, Е.В. Просекова, В.К. Ковальчук

Тихоокеанский государственный медицинский университет (690002, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Оценивали содержание интерферонов I, II и III типов в сыворотке крови 50 пациентов с опоясывающим герпесом и 30 здоровых добровольцев. У пациентов с герпесом обнаружено достоверное снижение содержания интерферонов β , λ_1 , λ_3 и $\lambda_{1/3}$. Таким образом, при опоясывающем герпесе наблюдался выраженный дефицит интерферонов I и III типов. Выявлена положительная корреляционная связь между концентрациями всех трех типов интерферона. Показано, что повышенное содержание интерферона- γ ассоциировано с более легким течением заболевания.

Ключевые слова: интерфероны, опоясывающий герпес

Изучение медиаторов иммунного ответа – одно из основных направлений теоретической и практической иммунологии, призванное помочь в разрешении различных терапевтических вопросов. Наиболее изученной группой медиаторов по праву считают интерфероны, названные таким образом за свойство «интерференции» – подавления вирусов. Система интерферонов включает в себя не только сами интерфероны – белковые молекулы, но и гены, кодирующие эти белки, их репрессоры, специфические клеточные рецепторы и особые ферментные системы, активирующиеся при взаимодействии интерферонов со своими рецепторами. Благодаря повсеместной распространенности этих белков и рецепторов к ним в организме спектр их функций многообразен, что представляет научный интерес и обуславливает активное изучение [2].

У человека выделяют три типа интерферонов. I тип (α , β , ω) обладает выраженной противовирусной активностью и служит одним из первых барьеров на пути инфекции. Генетически отличный от представителей I типа интерферон- γ – единственный известный представитель II типа интерферонов, реализующий иммунорегуляторную функцию [3]. III тип, представленный интерферонами λ_1 , λ_2 , λ_3 и λ_4 , исследован не так глубоко, как вышеназванные, однако его роль в противоопухолевой защите и воспалении при различных вирусных инфекциях широко освещено в научных работах. Оценка показателей интерферонов статуса имеет важное диагностическое значение при многих заболеваниях, в т.ч. инфекционного и аутоиммунного характеров. Отдельного внимания заслуживает данный аспект при изучении вирусных инфекций.

Герпесвирусы обладают способностью длительное время находиться в организме в состоянии персистенции, не инициируя клинических проявлений. Их способность влиять на иммунный ответ человека, «ускользая» от защитных механизмов как врожденного, так и адаптивного иммунитета, считается фактором, обуславливающим хронизацию инфекции. Вирус

ветряной оспы, поражающий не только эпителиальные и нервные клетки, но и лимфоциты благодаря своей способности к реактивации на фоне иммунодепрессии, вызывает развитие опоясывающего герпеса – заболевания способного снижать качество жизни пациента на длительный срок [14].

Ранее нами были исследованы уровни интерферонов γ и λ_1 в сыворотке крови пациентов с опоясывающим герпесом. Было определено снижение концентрации обоих белков, однако исследование было проведено на ограниченном числе наблюдений (15 человек), и в его дизайн не входил анализ интерферонов I типа [1].

Целью настоящей работы стала оценка содержания интерферонов всех трех типов в сыворотке крови больных опоясывающим герпесом.

Материал и методы

На базе инфекционного отделения Краевой клинической больницы № 2 (г. Владивосток) были обследованы 50 пациентов 30–70 лет, находившихся на лечении по поводу опоясывающего герпеса (основная группа). Группу контроля сформировали 30 здоровых добровольцев. Диагноз во всех случаях был установлен на основании жалоб, данных анамнеза, характерной клинической картины и верифицирован путем определения Anti-Varicella-Zoster-gE иммуноглобулина G и выявления ДНК вируса в слюне методом полимеразной цепной реакции. Сыворотка венозной крови исследовалась в первые 72 часа после появления характерных жалоб и поступления в стационар. Пациенты получали симптоматическую, противовирусную терапию (ацикловир 2000 мг в сутки). Определение уровней интерферонов β , γ , λ_1 , λ_3 и $\lambda_{1/3}$ проводили с помощью специфических реактивов фирмы R&D Diagnostics Inc. (США) методом сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа, согласно прилагаемым инструкциям. Результаты учитывали с помощью иммуноферментного анализатора Multiscan (Финляндия). Расчет концентрации цитокинов осуществляли путем

построения калибровочных кривых с помощью компьютерной программы. Данные представляли в виде медианы и двух квартилей (Me, Q₂₅, Q₇₅). Статистическая обработка проводилась с использованием программы IBM SPSS Statistics v. 16. Внутри- и межгрупповые различия оценивали с помощью критерия Манна-Уитни. Взаимосвязь показателей анализировали по коэффициенту ранговой корреляции Спирмена (ρ). Значения коэффициента корреляции от 0 до 0,3 интерпретировались как «очень слабая», от 0,3 до 0,5 – как «слабая», от 0,5 до 0,7 – как «средняя», от 0,7 до 0,9 – как «высокая» и от 0,9 до 1,0 – как «очень высокая». Уровень доверительной вероятности был задан равным 95 %, т.е. нулевые гипотезы отвергались в том случае, когда достигнутый уровень значимости p используемого статистического критерия принимал значения менее 0,05. Объем выполненных исследований позволил оценить результаты с достоверностью 95–99 %.

Результаты исследования

Сывороточное содержание интерферона-β, и всех λ-интерферонов при опоясывающем герпесе оказалось достоверно ниже, чем в контроле (табл. 1). Было установлено наличие слабой положительной корреляции (ρ≈0,4) между уровнем интерферона-β и уровнями интерферонов λ_{1/3}, и γ, положительной корреляции средней силы (ρ≈0,6) между уровнями интерферонов γ и λ_{1/3}. (табл. 2)

Таблица 1

Содержание интерферонов в сыворотке венозной крови пациентов с опоясывающим герпесом

Группа		Содержание интерферонов, пг/мл				
		β	γ	λ ₁	λ ₃	λ _{1/3}
Основная	Me	0,40	18,69	10,66	4,64	1,80
	Q ₂₅	0,15	9,92	1,75	0,24	1,13
	Q ₇₅	5,98	27,13	35,41	42,05	14,88
Контроль	Me	21,32	14,77	96,31	208,71	27,41
	Q ₂₅	9,72	11,57	38,58	183,37	20,40
	Q ₇₅	41,28	23,63	203,29	241,60	46,24

Примечание: разница между основной и контрольной группами по всем интерферонам, за исключением интерферона-γ, статистически значима.

Таблица 2

Корреляция между уровнями интерферонов (ИНФ) в сыворотке крови пациентов с опоясывающим герпесом

ρ	ИНФ-β	ИНФ-γ	ИНФ-λ ₁	ИНФ-λ ₃	ИНФ-λ _{1/3}
ИНФ-β	1,0	0,436	0,467	-0,143	0,356
ИНФ-γ	0,436	1,0	0,067	-0,029	0,550
ИНФ-λ ₁	0,468	0,067	1,0	0,346	0,014
ИНФ-λ ₃	-0,143	-0,029	0,346	1,0	-0,402
ИНФ-λ _{1/3}	0,356	0,550	0,014	-0,402	1,0

Примечание: выделены ячейки с коэффициентами корреляции, имеющими статистическую значимость.

Обсуждение полученных данных

Интерферон-β, как и интерферон-α, обеспечивает противовирусную защиту организма. В исследовании С.С. Ку et al. [8] было представлено ингибирующее воздействие интерферона-α на белок IE62, ответственный за репликацию вируса. Подобные данные говорят и о влиянии интерферона-β. Однако, обратив внимание на иммуносупрессивную активность интерферона-β, которая хорошо продемонстрирована в работах, посвященных применению его препаратов при рассеянном склерозе, С.Т. Ng et al. [11] опубликовали результаты исследования об участии этого интерферона в процессе персистенции вирусных инфекций. Ими было установлено отсутствие ингибирующего влияния интерферона-β на вирус в ранний период инфекции. Кроме этого, авторами было показано усиление Т-клеточной реакции при блокировании сигнальной активности интерферона-β [11]. В настоящее время не существует доказательств, позволяющих считать высокий уровень этого цитокина маркером реактивации вируса ветряной оспы, однако есть данные о повышении титра специфических иммуноглобулин G-антител к этому возбудителю во время лечения рассеянного склероза введением препаратов интерферона-β [12].

Раннее нами было продемонстрировано снижение уровня интерферона-γ при опоясывающем герпесе. Однако расширение основной группы пациентов позволяет говорить об отсутствии здесь достоверных различий. В работе С.К. Kim et al. [7] было показано снижение продукции интерферона-γ натуральными киллерами при данном заболевании. Связь между этими клетками и интерфероном-γ была также продемонстрирована в работе R.A. Groen et al. [6]. Интерлейкин-12 индуцирует продукцию интерферона-γ натуральными киллерами. Учитывая наши данные о том, что не у всех пациентов содержание интерферона-γ в сыворотке крови было ниже контрольных цифр, можно предположить различный отдаленный прогноз выраженности неврологических симптомов и развития постгерпетической невралгии и согласиться с мнением N.L. Baird et al. [5] о положительном влиянии интерферона-γ на выживаемость нейронов, инфицированных вирусом ветряной оспы.

Обладая структурным родством к цитокинам из семейства интерлейкина-10, по своей функциональной активности представители λ-интерферонов находятся ближе к интерферонам I типа. Впрочем, интерфероны III типа оказывают влияние на более узкий спектр клеток и, по мнению ряда исследователей, в отличие от первых обладают не прямой, а опосредованной противовирусной активностью, реализуемой через стимуляцию иммунитета [4, 9]. Полученные нами данные о снижении содержания как λ-интерферонов, так и интерферона-β в сыворотке крови, согласуются с мнением Z. Yin et al. [15] о важности аутоstimуляции плазмочитарных дендритных

клеток интерферонами I и III типов в обеспечении противовирусного иммунного ответа. Заслуживают внимания и сведения об ингибирующем влиянии повышенного сывороточного уровня цинка на концентрацию интерферона- λ_3 , что может отрицательно сказываться на прогнозе хронических вирусных инфекций [13]. Следует поддержать мнение I. Misumi и J.K. Whitmire [10] о положительном влиянии λ -интерферонов на Т-клеточный ответ при хронической инфекции. Теми же авторами был установлен факт лимитирования Т-клеточной реакции в период манифестации инфекции [10].

Различная по силе положительная корреляционная связь между тремя типами интерферонов может трактоваться с разных позиций. Учитывая, что основной продуцент интерферонов I и III типов – плазматические дендритные клетки, согласованное изменение их уровня вполне ожидаемо. Слабая корреляционная связь может быть обусловлена тем, что не все субтипы этих клеток одновременно продуцируют и λ -интерфероны, и интерфероны I типа [15].

Уровень интерферонов III типа связан с уровнем интерферона- γ более сильной связью, чем с уровнем интерферона- β . Прямое положительное влияние λ -интерферонов на уровень интерлейкина-12, а через него на содержание в крови натуральных киллеров, представленное R.A. Groen et al. [6], вероятно, служит одной из причин этой связи. В то же время слабая положительная корреляционная связь между концентрациями интерферонов β и γ скорее всего обусловлена общей клеткой-продуцентом интерферонов I и III типов, однако данный вопрос требует дополнительного изучения.

Состояние системы интерферонов считается важным аспектом, обуславливающим развитие опоясывающего герпеса. Несмотря на длительную персистенцию возбудителя в организме и присутствие специфических антител в сыворотке крови до реактивации вируса активного влияния на содержание интерферонов он не оказывает. Но все же в случае развития дисбаланса противовирусная защита организма нарушается, что может привести к манифестации заболевания. Исходя из данных литературы, мы можем полагать, что абсолютное или относительное повышение уровня интерферона- β на фоне сниженного или нормального уровня интерферона- γ , при сохранном или повышенном уровне λ -интерферонов, может спровоцировать ослабление Т-клеточной реакции и таким образом послужить реактивации вируса ветряной оспы. Однако вместо ожидаемого повышения сывороточного содержания интерферонов в ответ на развитие инфекции полноценной иммунной реакции в большинстве случаев здесь не развивается. Хронический интерферонодефицит, сопровождающий опоясывающий герпес, вызывает не только сопутствующие иммунные нарушения, но и длительное вялотекущее воспаление в периферической нервной системе, что порождает предполагаемую

рядом исследователей связь между этой инфекцией и рассеянным склерозом [11].

Выводы

1. Опоясывающий герпес сопровождается выраженным дефицитом интерферонов I и III типа, без достоверных изменений уровня сывороточного интерферона- γ .
2. Выявлена положительная корреляционная связь между всеми тремя типами интерферонов в сыворотке венозной крови: слабая между уровнями интерферонов β и γ , β и $\lambda_{1/3}$ и средней силы между уровнями интерферонов γ и $\lambda_{1/3}$.
3. Повышенное содержание интерферона- γ в сыворотке крови можно считать благоприятным фактором более легкого течения опоясывающего герпеса.

Литература / References

1. Кныш С.В., Маркелова Е.В., Неvezhкина Т.А. [и др.]. Уровень интерферона-лямбда-1 и интерферона-гамма в сыворотке крови пациентов с опоясывающим герпесом // Российский иммунологический журнал. 2017. Т. 11, № 4. С. 712–714.
2. Knysh S.V., Markelova E.V., T.A. Nevezhkina [et al.]. Serum IFN-lambda and IFN-gamma of herpes zoster patients // Russian Journal of Immunology. 2017. Vol. 11, No. 4. P. 712–714.
3. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека. СПб.: Фолиант, 2018. 512 с.
4. Simbirtsev A.S. Cytokines in the pathogenesis and treatment of human diseases. Saint Petersburg: Foliant, 2018. 512 p.
5. Скляр Л.Ф., Маркелова Е.В., Нагорная А.В., Сотниченко С.А. Особенности клиники и состояния врожденного иммунитета при сочетанных герпесвирусных менингоэнцефалитах у ВИЧ-инфицированных пациентов // Тихоокеанский медицинский журнал. 2014. № 1. С. 82–85.
6. Sklyar L.F., Markelova E.V., Nagornaya A.V., Sotnichenko S.A. Clinical features and the natural immunity state of the HIV-infected patients having herpes meningoencephalitis // Pacific Medical Journal. 2014. No. 1. P. 82–85.
7. Ank N., West H., Bartholdy C. [et al.]. Lambda interferon (IFN- λ), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo // Journal of Virology. 2006. Vol. 80, No. 9. P. 4501–4509.
8. Baird N.L., Bowlin J.L., Hotz T.J. [et al.]. Interferon gamma prolongs survival of Varicella-Zoster virus infected human neurons in vitro // Journal of Virology. 2015. Vol. 89, No. 14. P. 7425–7427.
9. Groen R.A., Boltjes A., Hou J. [et al.]. IFN- λ -mediated IL-12 production in macrophages induces IFN- γ production in human NK cells // Eur. J. Immunol. 2015. No. 45. P. 250–259.
10. Kim C.K., Choi Y.M., Bae E. [et al.]. Reduced NK cell IFN- γ secretion and psychological stress are independently associated with herpes zoster. // PLoS ONE. Vol. 13, No 2. P. e0193299.
11. Ku C.C., Chang Y.H., Chien Y., Lee T.L. Type I interferon inhibits varicella-zoster virus replication by interfering with the dynamic interaction between mediator and IE62 within replication compartments // Cell Biosci. 2016. Vol. 6 doi: 10.1186/s13578-016-0086-6.
12. Li J., Ye L., Wang X. [et al.]. Induction of IFN-lambda contributes to TLR3-mediated HSV-1 inhibition in astrocytes // J. Neurosci. Res. 2012. Vol. 90, No. 2. P. 399–406.
13. Misumi I., Whitmire J.K. FN-lambda exerts opposing effects on T cell responses depending on the chronicity of the virus infection // J. Immunol. 2014. Vol. 192, No. 8. P. 3596–3606.
14. Ng C.T., Sullivan B.M., Teijaro J.R. [et al.]. Blockade of interferon beta, but not interferon alpha, signaling controls persistent viral infection // Cell Host Microbe. 2015. Vol. 17, No 5. P. 653–661.
15. Petersen T., Moller-Larsen A., Ellermann-Eriksen S. [et al.]. Effects of interferon-beta therapy on elements in the antiviral immune response towards the human herpesviruses EBV, HSV, and

- VZV, and to the human endogenous retroviruses HERV-H and HERV-W in multiple sclerosis // *Journal of Neuroimmunology*. 2012. No. 249. P. 105–108.
13. Read S.A., O'Connor K.S., Suppiah V. [et al.]. Zinc is a potent and specific inhibitor of IFN- λ 3 signalling // *Nature communications*. 2017. Vol 8. doi: 10.1038/ncomms15245 (2017).
 14. Sen N., Arvin, A.M. Dissecting the molecular mechanisms of the tropism of Varicella-Zoster virus for human T cells // *Journal of Virology*. 2016. Vol. 90, No. 7. P. 3284–3287.
 15. Yin Z., Dai J., Deng J. [et al.]. Type III IFNs are produced by and stimulate human plasmacytoid dendritic cells // *J. Immunol*. 2012. Vol. 189, No. 6. P. 2735–2745.

Поступила в редакцию 06.09.2018.

FEATURES OF INTERFERON SYSTEM IN PATIENTS WITH HERPES ZOSTER

S.V. Knysh, V.A. Malkov, E.V. Prosekova, V.K. Kovalchuk
Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok
690002 Russian Federation)

Objective. Study of mediators of immune system – is one of the main immunology direction. Interferons (IFN) are the most studied group of mediators. It includes three types of IFN – I type (α , β , ω) with marked antiviral activity, II type (γ) – whose main function is immune regulation. And III type (λ_1 , λ_2 , λ_3 , and λ_4) with antitumor and antiviral activity. The aim of work: to study condition

of IFN system by evaluating the serum level of IFN's in patients with herpes zoster.

Methods. 50 patients with herpes zoster were examined. Serum was taken in first 72 hours after disease manifestation. The level of IFN- β , IFN- γ , IFN- λ_1 , IFN- λ_3 , IFN- $\lambda_{1/3}$ was determined by using specific reagents R&D Diagnostics Inc. (USA). The data were presented as a median and two quartiles (Me, Q_{25} , Q_{75}). The interrelation of indicators was estimated by the Spearman correlation coefficient.

Results. The serum level of IFN- β , IFN- λ_1 , IFN- λ_3 , IFN- $\lambda_{1/3}$ were significantly lower in patients with herpes zoster in comparison with the control group. Also, the weak positive correlation between IFN- β and IFN- $\lambda_{1/3}$, IFN- β and IFN- γ ; and medium positive correlation between IFN- γ and IFN- $\lambda_{1/3}$ were established.

Conclusions. The interferons deficiency was identified. Presumably the correlation between IFN- γ and IFN- $\lambda_{1/3}$ is due to common type of producer cell – plasmacytoid dendritic cells. In addition, the direct positive effect of IFN- λ on interleukin-12 (IL-12) and on NK-cells through IL-12 cause positive effect of IFN- λ to IFN- γ . Disbalance in interferons ratio – one of the potent factors of varicella zoster virus reactivation. In addition, the high serum level of IFN- γ is a factor of mild course of disease.

Keywords: *interferons, herpes zoster*

Pacific Medical Journal, 2018, No. 4, p. 34–37.

УДК 616.248–056.43:612.017.1

DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2018.4.37–40

Оценка системы интерлейкина-17 у детей с аллергической бронхиальной астмой

Е.В. Просекова, А.И. Турянская, В.А. Сабыныч

Тихоокеанский государственный медицинский университет (690002, Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Приведена оценка показателей Th17 субпопуляции Т-лимфоцитов в периферической крови, сывороточного содержания интерлейкинов 17А и 17F и анализ особенностей функционирования системы интерлейкина-17 при аллергическом воспалении у детей с бронхиальной астмой и здоровых сверстников. Представлены сравнительные данные особенностей функционирования системы интерлейкина-17 и взаимосвязей с сывороточным содержанием общего и специфического иммуноглобулина Е, количеством эозинофилов и нейтрофилов в периферической крови и назальном секрете у детей с бронхиальной астмой и детей с сочетанием бронхиальной астмы и аллергического ринита.

Ключевые слова: *бронхиальная астма, аллергический ринит, цитокины, лейкоциты*

Система цитокинов участвует в реализации физиологических и патофизиологических реакций организма, модулирует локальные и системные механизмы защиты и обеспечивает согласованные действия иммунной, эндокринной и нервной системы в иммунном ответе и реакциях воспаления [1, 2, 6]. Интерлейкины семейства 17 регулируют экспрессию различных воспалительных медиаторов (включая цитокины, хемокины и молекулы адгезии), в патогенезе иммунных и воспалительных реакций [4, 5, 10, 11, 14, 15]. Интерлейкин (ИЛ)-17 – регуляторный гомодимерный цитокин, продуцируемый активированными Т-лимфоцитами, который связывается рецепторами широкого круга клеток, включая покоящиеся Т-клетки и стимулирует секрецию ряда цитокинов фибробластами, пролиферацию Т-клеток, дифференциацию нейтрофилов и активирует макрофаги [6, 7, 9, 11].

Просекова Елена Викторовна – д-р мед. наук, профессор, заведующая кафедрой клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии ТТМУ; e-mail: pros.ev@mail.ru

В формировании воспаления при бронхиальной астме важная роль отводится дисбалансу хелперных субпопуляций Т-лимфоцитов – Th1/Th2, Th17, Th9 и T_{reg} , влияющих на разные аспекты воспаления и бронхиальную гиперреактивность. Th17-субпопуляция и тучные клетки способны секретировать ИЛ 17А и 17F, а ИЛ-17Е секретруется Th2-лимфоцитами. ИЛ-17А и ИЛ-17F наиболее близкие гомологи, оказывающие воспалительные эффекты, вызывающие продукцию моноцитарного хемотаксического протеина-1 и макрофагального воспалительного протеина-2 [12]. Взаимодействие ИЛ-17 и γ -интерферона на клетках-мишенях влияет на провоспалительные функции Th17-клеток. Последние помимо противовоспалительного эффекта обладают способностью к модуляции иммунного ответа и продуцируют два представителя семейства ИЛ-17: ИЛ-17А и ИЛ-17F. ИЛ-17 усиливает адгезию Т-лимфоцитов и Т-клеточную цитотоксичность [5, 8, 10–14]. S. Nakae et al. [13] отметили слабую выраженность или

полное отсутствие у ИЛ-17 способности ингибировать дифференцировку Th1- и Th2-лимфоцитов.

В патогенезе бронхиальной астмы (БА) ведущим механизмом считается хронический воспалительный процесс в дыхательных путях, развивающийся при взаимодействии различных иммунокомпетентных клеток и медиаторов воспаления [2, 5]. В литературе представлены данные об участии ИЛ-17 в регуляции деградации нейтрофилов и усилении эозинофильного воспаления в дыхательных путях, опосредованном Т-хелперами 2-го типа, о способности ИЛ-17А вызывать увеличение экспрессии мРНК циклооксигеназы-2 и костимуляторных молекул ICAM-1, усиливать Т-клеточную активацию [8, 12, 13]. Анализ уровней цитокинов предоставляет информацию о функциональной активности различных типов иммунокомпетентных клеток, тяжести и распространенности воспалительного процесса, соотношении процессов активации клеток-эффекторов, что актуально при дифференциальной диагностике иммунопатологических процессов [1–3, 5]. Для определения иммунных механизмов реализации фенотипов и оптимизации терапии аллергических заболеваний, особо актуально изучение особенностей функционирования системы ИЛ-17.

Цель исследования: оценка Th17-субпопуляции Т-лимфоцитов и анализ особенностей сывороточного содержания ИЛ-17А и ИЛ-17F у детей с аллергической БА.

Материал и методы

В исследование включено 60 детей 3–11 лет с аллергической БА легкой (11,7 %) и средней (88,3 %) степеней тяжести на базисной терапии ингаляционными глюкокортикостероидами. В 44 случаях БА сочеталась с аллергическим ринитом. Контролем послужили результаты обследования 30 здоровых сверстников. Работа выполнена на базах городского аллерго-респираторного центра и центра здоровья КГБУЗ «Владивостокский клинико-диагностический центр» (главный врач – А.А. Кабиева). Верификация фенотипа БА осуществлялась в соответствии с рекомендациями международного согласительного документа PRACTALL (2008) European Academy of Allergy and Clinical Immunology and the American Academy of Allergy и Национальной программы «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактики» (2017). Критериями исключения из исследования стали вирус-индуцированный фенотип и тяжелое течение БА, а также применение иммунокорректирующих препаратов в предшествующие шесть месяцев.

Клинико-лабораторное обследование осуществляли на кафедре клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии и центральной научно-исследовательской лаборатории ТГМУ (ректор – В.Б. Шуматов). Дизайн исследования одобрен Междисциплинарным комитетом по этике ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России 23.06.2014 г., протокол № 7.

Материалом для исследования иммунологических параметров стала венозная кровь. Анализ лейкоцитов,

субпопуляционного состава лимфоцитов проводили с помощью автоматического анализатора многопараметрового проточного цитофлюориметра MACSQuant TM Analyzer 10 (Miltenyi Biotec GmbH, Германия). В исследуемые образцы вносили поочередно моноклональные антитела к поверхностным антигенам CD45 FITC, CD4 PE, наивных Th-клеток, CD45RA-VioBlue, Th-клеток памяти CD45RO-PerCP (Miltenyi Biotec GmbH, Германия) и моноклональные антитела к мембранному хемокиновому рецептору CCR6, специфичному для Th17-клеток (CD196 (CCR6)-APC, клон REA277; Miltenyi Biotec GmbH, Германия), создавая четырехцветную метку. Результаты представлены в виде процента позитивных клеток и в абсолютных значениях с учетом данных клинического анализа крови.

Иммуноферментный анализ содержания интерлейкинов 17А и 17F в сыворотке крови проводили реактивами фирмы eBiociens (Bender Medsystems GmbH, Австрия) согласно прилагаемой инструкции. Содержание общего и специфического иммуноглобулина Е определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов ООО «Компания Алкор Био» (г. Санкт-Петербург).

Для статистической обработки цифровых данных применяли методы описательной, параметрической (при нормальном распределении показателей и коэффициенте вариации $\leq 30\%$) и непараметрической (при распределении, отличном от нормального, и коэффициенте вариации $>30\%$) статистики в программе Statistica 10. Делали подсчет средней арифметической (M), медианы (Me), среднего квадратичного отклонения (σ), средней ошибки средней арифметической ($\pm m$), верхнего и нижнего квартиля (LQ–HQ), 95 %-ного доверительного интервала (ДИ), коэффициента достоверности показателя (t) и различий (t и p). Использовали методы корреляционного анализа (критерий χ^2 и однофакторного дисперсного анализа – критерий Фишера, и r – коэффициента корреляции). Оценивали связи коэффициентом ранговой корреляции Спирмена при проверке нормальности распределения значений признака (Shapiro–Wilk). Объем выполненных исследований и использование соответствующих статистических методов позволили оценить результаты с достоверностью и критическим уровнем значимости $p \leq 0,05$.

Результаты исследования

Уровень ИЛ-17А у здоровых детей колебался в диапазоне от 23,8 до 97,9 пг/мл (Me – 68,7 пг/мл, LQ–HQ – 47,4–83,3 пг/мл) и был значимо ниже, чем у детей с БА: 89,8–365,5 пг/мл (Me – 123,7 пг/мл, LQ–HQ – 107–139 пг/мл). В группе детей с БА, сочетавшейся с аллергическим ринитом, сывороточное содержание ИЛ-17А было выше, чем в группе детей без аллергического ринита: Me – 126,2 и 119,5 пг/мл, LQ–HQ – 106,0–150,1 и 108,5–125,9 пг/мл, соответственно. В период клинической ремиссии и в период обострения БА уровни ИЛ-17А значимо не изменялись (Me – 123,9 и 122,1 пг/мл, LQ–HQ – 107–137 и 108,0–148,1 пг/мл, соответственно).

Таблица 1

Характеристики лейкоцитов в периферической крови детей с БА и здоровых сверстников

Показатель		Группы наблюдения				p
		здоровые (n=30)		дети с БА (n=60)		
		M±m	ДИ	M±m	ДИ	
Лейкоциты	10 ⁹ /л	7,51±0,24	7,11–7,92	7,38±0,06	7,28–7,49	>0,05
	%	29,90±0,71	28,72–31,08	36,63±0,87	37,19–38,07	<0,001
Лимфоциты	10 ⁹ /л	2,08±0,08	1,93–2,23	2,95±0,08	2,82–3,09	<0,001
	%	58,03±1,29	55,88–60,18	49,99±1,08	48,19–51,78	<0,001
Нейтрофилы	10 ⁹ /л	4,12±0,19	3,80–4,43	3,77±0,11	3,59–3,95	<0,01
	%	1,53±0,14	1,3–1,76	7,38±0,33	6,83–7,93	<0,001
Эозинофилы	10 ⁹ /л	0,11±0,010	0,09–0,13	0,54±0,03	0,49–0,59	<0,001
	%	70,96±1,25	68,06–72,36	71,03±0,90	69,53–72,94	>0,05
Т-лимфоциты CD3 ⁺ CD19 ⁻	кл/мкл	2298,90±134,95	2116,47–2497,85	1902,83±112,39	1716,26–2089,41	<0,01
	%	39,91±1,37	37,64–42,18	35,47±1,23	33,44–37,50	<0,001
Т-хелперы CD3 ⁺ CD4 ⁺	кл/мкл	1335,91±93,51	1180,68–1491,13	953,42±58,12	856,92–1049,91	<0,001
	%	27,22±1,24	25,16–29,27	28,39±1,09	26,58–30,28	>0,05
Т-цитотоксические CD3 ⁺ CD8 ⁺	кл/мкл	893,73±55,73	801,22–986,23	799,42±65,03	691,47–907,36	>0,05
	%	21,11±1,72	18,12–23,82	98,05±19,83	65,12–130,98	<0,001
Th17	CD17 ⁺	кл/мкл	18,12–23,82	98,05±19,83	65,12–130,98	<0,001
	CD17 ⁺ CD45RA ⁺	кл/мкл	11,09±0,95	9,45–12,50	56,68±13,00	35,09–78,27

Таблица 2

Содержание лейкоцитов в периферической крови детей с аллергическим ринитом (АР) и БА

Показатель		Группы наблюдения				p
		дети с БА и АР (n=44)		дети с БА (n=16)		
		M±m	ДИ	M±m	ДИ	
Лейкоциты	10 ⁹ /л	7,92±0,07	7,79–8,04	6,64±0,12	6,43–6,85	<0,001
	%	36,73±1,09	34,9–38,54	36,38±1,23	34,34–38,42	>0,05
Лимфоциты	10 ⁹ /л	3,00±0,10	2,83–3,17	2,83±0,09	2,68–2,97	>0,05
	%	51,47±1,36	49,21–53,72	45,93±1,03	42,26–47,60	<0,01
Нейтрофилы	10 ⁹ /л	3,91±0,14	3,68–4,13	3,42±0,10	3,25–3,58	<0,01
	%	130,72±14,81	106,14–155,31	33,12±23,38	14,31–91,93	<0,05
Th17	CD17 ⁺	кл/мкл	106,14–155,31	33,12±23,38	14,31–91,93	<0,05
	CD17 ⁺ CD45RA ⁺	кл/мкл	83,09±10,35	65,90–100,27	20,37±8,06	6,98–33,76

Диапазон сывороточного содержания ИЛ-17F у детей с БА составил 19,2–76,0 пг/мл (Me – 28,6 пг/мл, LQ–HQ – 25,2–36,5 пг/мл). У здоровых сверстников определялись практически аналогичные показатели: 21,6–76,0 пг/мл (Me – 27,7 пг/мл, LQ–HQ – 25,3–35,0 пг/мл). Коэффициент корреляции сывороточного содержания ИЛ-17A и уровней общего и специфического иммуноглобулина E в группе контроля составил $r = -0,103$ и $r = 0,111$, а по ИЛ-17F – $r = 0,215$ и $r = 0,391$, соответственно. У детей с аллергической БА по сравнению со здоровыми сверстниками выявлены высокий уровень сывороточного иммуноглобулина E и прямая зависимость между содержанием в сыворотке крови ИЛ-17A и иммуноглобулина E ($r = 0,35$).

Отмечены сопоставимые показатели абсолютно числа лейкоцитов в периферической крови детей с БА и здоровых сверстников при достоверно более высокой численности лимфоцитов при реализации болезни и различия абсолютного количества эозинофилов и нейтрофилов. В периферической крови детей с аллергической БА в сравнении с показателями

здоровых сверстников отмечена значимо меньшая обеспеченность Т-лимфоцитами, дефицит Т-хелперных популяций и высокие уровни Th17-клеток (табл. 1).

При реализации БА в сочетании с аллергическим ринитом выявлены более высокие показатели по лейкоцитам, эозинофилам, нейтрофилам и Th17-лимфоцитам по сравнению с таковыми у детей только с БА (табл. 2).

Обсуждение полученных данных

Исследования последних лет отмечают значимость дисбаланса в системе цитокинов и продуцирующих их клеток, влияющего на эффективность противовоспалительной терапии различных фенотипов БА у детей [6, 7, 15]. Установлено, что лимфоциты Th17 воздействуют на формирование гиперплазии бокаловидных клеток, а ИЛ-17 служит основным фактором, усиливающим продукцию муцина и гиперплазию бокаловидных клеток в бронхах больных БА, что может влиять на местное воспаление, индуцируя выброс

провоспалительных цитокинов. ИЛ-17F совместно с ИЛ-17A вызывает продукцию хемокинов, влияет на транскрипцию мРНК и трансляцию белка [5, 7–9, 12].

При анализе содержания интерлейкинов-17 в сыворотке крови детей с БА зафиксированы высокие уровни ИЛ-17A с наличием умеренной силы прямой корреляции с числом нейтрофилов в периферической крови ($r=0,366$) и эозинофилов в назальном секрете ($r=0,324$). Отсутствовала связь с уровнем эозинофилов в периферической крови ($r=0,04$). В группе здоровых выявлена прямая корреляция умеренной силы сывороточного содержания ИЛ-17A и ИЛ17F с абсолютным числом эозинофилов в периферической крови ($r=0,312$ и $r=0,326$, соответственно).

Проведенные исследования системы интерлейкина-17 у детей с БА показали патогенетическую значимость дисбаланса в системе этих цитокинов и влияние субпопуляции лимфоцитов Th17 на различные, ассоциированные с Т-хелперами 1-го и 2-го типов аспекты воспаления и гиперреактивности бронхов.

Заключение

Выявлена вариативность функциональных и количественных характеристик в зависимости от распространенности аллергического воспаления при сочетанном течении БА и аллергического ринита, что позволяет рекомендовать оценку клеточной субпопуляции Th17 и продуцируемых ею ИЛ-17A и ИЛ-17F в качестве маркеров нарушений функционирования иммунной системы при аллергических заболеваниях у детей.

Литература / References

1. Борисова Т.В., Караулов А.В., Сокуренок С.И. Цитокины: участие в патогенезе и перспективы лечебного применения при бронхиальной астме // Клиническая практика. 2010. Т. 2, № 2. С. 81–87.
Borisova T.V., Karaulov A.V., Sokurenko S.I. Cytokines: participation in pathogenesis and perspectives of therapeutic use in bronchial asthma // Clinical Practice. 2010. Vol. 2, No. 2. P. 81–87.
2. Борисова Т.В., Сокуренок С.И., Караулов А.В. Особенности цитокинового профиля, фенотипа и фагоцитарной активности нейтрофилов в крови больных бронхиальной астмой в период обострения // Клиническая практика. 2013. Т. 15, № 3. С. 11–19.
Borisova T.V., Sokurenko S.I., Karaulov A.V. Characteristics of cytokines, phenotypic features and neutrophilphagocytosis activity in asthmatic patients during exacerbation // Clinical Practice. 2013. Vol. 15, No. 3. P. 11–19.
3. Кайдашев И.П. Т-клеточная регуляция при atopических заболеваниях // Клиническая иммунология. Аллергология. Инфектология. 2011. № 9–10. С. 18–21.
Kaidashev I.P. T-cell regulation in atopical diseases // Clinical Immunology. Allergy. Infectology. 2011. No. 9–10. P. 18–21.
4. Красницкая А.С., Полятика А.Н. Особенности локального цитокинового статуса у пациентов с хроническим тонзиллитом различной этиологии // Тихоокеанский медицинский журнал. 2013. № 1. С. 62–64.
Krasnitskaya A.S., Polytika A.N. Specific characteristics of cytokine status in patients with chronic tonsillitis of different aetiology // Pacific Medical Journal. 2013. No. 1. P. 62–64.
5. Национальная программа «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактики» / под ред. Н.А. Геппе, Н.Г. Колосова, Е.Г. Кондюрина [и др.]. М., 2017. 160 с.
Bronchial asthma in children. The strategy of treatment and prevention: The national program / Ed. N.A. Geppe, N.G. Kolosova, E.G. Kondyurina [et al.]. Moscow, 2017. 160 p.
6. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека. СПб.: Фолиант, 2018. 512 с.
Simbirtsev A.S. Cytokines in the pathogenesis and treatment of human diseases. Saint Petersburg: Foliant, 2018. 512 p.
7. Ciprandi G., De Amici M., Murdaca G. [et al.]. Serum interleukin-17 levels are related to clinical severity in allergic rhinitis // Allergy. 2009. Vol. 9, No. 64. P. 1375–1378.
8. Doe C., Bafahel M., Siddiqui S. [et al.]. Expression of the T helper 17-associated cytokines IL-17A and IL-17F in asthma and COPD // Chest. 2010. Vol. 5, No. 138. P. 1140–1147.
9. Huang H., Kim H.J., Chang E.J. [et al.]. IL-17 stimulates the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells: implications for bone remodeling // Cell Death Differ. 2009. Vol. 16. P. 1332–1343.
10. Koga C., Kabashima K., Shiraishi N. [et al.]. Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis // J. Invest. Dermatol. 2008. Vol. 128. P. 2625–2630.
11. Louten J., Boniface K., de Waal Malefyt R. Development and function of TH17 cells in health and disease // J. Allergy Clin. Immunol. 2009. Vol. 123, No. 5. P. 1004–1011.
12. Lyoda M., Shibata T., Kawaguchi M. [et al.]. IL-17A and IL-17F stimulate chemokines via MAPK pathways (ERK1/2 and p38 but not JNK) in mouse cultured mesangial cells: synergy with TNF- α and IL-1 β // Am. J. Physiol. Renal. Physiol. 2010. No. 3. P. 779–787.
13. Nakae S., Iwakura Y., Sut H. [et al.]. Phenotypic differences between Th1 and Th2 cells and negative regulation by Th17 // J. Leukoc. Biol. 2007. Vol. 81. P. 1258–1268.
14. Otsuka A., Kabashima K. Mast cells and basophils in cutaneous immune responses // Allergy. 2015. Vol. 70. P. 131–140.
15. Seoung J.P., Lee Y.C. Interleukin-17 regulation: an attractive therapeutic approach for asthma // Respiratory Research. 2010. Vol. 11. P. 78.

Поступила в редакцию 20.07.2018.

ASSESSMENT OF INTERLEUKIN-17 SYSTEM IN CHILDREN WITH ALLERGIC BRONCHIAL ASTHMA

E.V. Prosekova, A.I. Turyanskaya, V.A. Sabynych
Pacific State Medical University (2 Ostryakova ave., Vladivostok, 690002, Russian Federation)

Objective. The study objective is to assess Th17 subpopulation of T-lymphocytes and to analyze the features of serum interleukins 17A and 17F (IL-17A, IL-17F) in children with allergic bronchial asthma.

Methods. The study includes 60 children with allergic bronchial asthma and 30 healthy children. Withdrawal criteria from the study was virus-induced phenotype, severe course of asthma, administration of immunocorrecting drugs. The material for the study is venous blood.

Cells were assessed with on a flow cytofluorimeter MACSQuant (Miltenyi Biotec GmbH, Germany). Immunoenzyme method was used to determine the content of IL-17A, IL-17F with eBiociens reagents (Bender Medsystems GmbH, Austria), IgE with reagents from the company Alkor Bio (St. Petersburg).

Results. In the serum of children with asthma, a high level of IL-17A was detected, a moderate direct correlation of its concentration with the number of neutrophils in the peripheral blood and eosinophils in the nasal secretion was determined.

Conclusions. Variability of the functional and quantitative characteristics of the interleukin-17 system was determined depending on the prevalence of allergic inflammation, the significance of imbalance in the interleukin-17 system, and the influence of Th17 lymphocytes on various aspects of inflammation and hyperreactivity of the bronchi associated with T-helpers, types 1 and 2.

Keywords: bronchial asthma, allergic rhinitis, cytokines, leukocytes

Pacific Medical Journal, 2018, No. 4, p. 37–40.

УДК 616–097:578:612.017.1

DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2018.4.41–45

Иммунные комплексы и их роль в активации иммунитета при ВИЧ-инфекции

Л.Б. Королевская¹, Е.В. Сайдакова¹, К.В. Шмагель¹, Н.Г. Шмагель^{1,2}¹ Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН (614081, г. Пермь, ул. Голева, 13),² Пермский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями (614088, г. Пермь, ул. Архитектора Связева, 21)

У 30 ВИЧ-инфицированных пациентов определено содержание циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) и относительное количество активированных Т-лимфоцитов. Установлены прямые корреляционные связи между концентрацией ЦИК и активацией Т-клеток. Исследована роль иммунных комплексов, содержащих антигены ВИЧ и противовирусные антитела, в активации клеток врожденного иммунитета. Выявлено, что стимуляция мононуклеаров неинфицированных доноров такими иммунными агрегатами приводит к усилению генерации кислорода и значительному увеличению относительного количества CD14⁺-клеток, синтезирующих интерлейкин-6. По-видимому, иммунные комплексы могут считаться еще одним из факторов активации иммунитета при ВИЧ-инфекции.

Ключевые слова: вирус иммунодефицита человека, активация иммунокомпетентных клеток, циркулирующие иммунные комплексы, активированные Т-лимфоциты

Инфекция, вызванная вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), приводит к постепенному снижению численности Т-лимфоцитов CD4⁺, развитию тяжелого иммунодефицита и гибели больного от оппортунистических инфекций. К настоящему времени установлено, что одной из причин истощения Т-клеток CD4⁺ служит хроническая иммунная активация [13]. У ВИЧ-инфицированных субъектов показатели активации иммунитета оказываются более информативными для прогноза заболевания, чем концентрация вируса в крови [9]. Следует отметить, что состояние активации характерно не только для Т-лимфоцитов CD4⁺, но и для В-лимфоцитов, моноцитов/макрофагов, Т-клеток CD8⁺, NK-клеток [2, 10, 12]. Причины системной активации иммунокомпетентных клеток при ВИЧ-инфекции остаются малопонятными и, по-видимому, могут быть многофакторными. Среди этих факторов рассматривают сам вирус и его продукты, сопутствующие инфекционные агенты (цитомегаловирус, возбудитель туберкулеза, вирус Эпштейна–Барра) [13]. Ряд авторов связывает активацию иммунитета при ВИЧ-инфекции с влиянием провоспалительных цитокинов, гомеостатической пролиферацией, снижением численности регуляторных Т-клеток, микробной транслокацией из кишечника [3–6].

Мы предполагаем, что, наряду с уже известными этиологическими факторами активации иммунитета, важную роль в этом процессе могут играть комплексы «антиген–антитело». Иммунные комплексы, состоящие из антигенов ВИЧ и противовирусных антител, постоянно присутствуют в кровотоке ВИЧ-инфицированных пациентов [11]. Также известно, что лигирование Fcγ-рецепторов на поверхности макрофагов

комплексами, содержащими иммуноглобулин G, приводит к активации клеток [1].

Целью данного исследования была оценка способности иммунных комплексов, в состав которых входят антигены ВИЧ и вирусспецифические антитела, активировать моноциты периферической крови.

Материал и методы

План работы был одобрен этическим комитетом Пермского краевого центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями (рег. № IRB00008964). Было обследовано 30 ВИЧ-инфицированных пациентов и 16 относительно здоровых людей. Для оценки стимуляции моноцитов иммунными комплексами в условиях *in vitro* дополнительно была использована кровь 10 здоровых добровольцев. Каждый участник дал письменное информированное согласие. ВИЧ-инфицированные больные и неинфицированные доноры были сопоставимы по возрасту и полу. Критерием включения в исследование было отсутствие вирусных гепатитов С и В. Забор крови проводили натощак из локтевой вены в вакуумные пробирки, содержащие этилендиаминтетрауксусную кислоту (Improvacuter). Мононуклеарные клетки получали центрифугированием (1500 об./мин, 40 мин) в градиенте плотности Диаколл (1,077, «Диа-М»). Выделенные клетки дважды отмывали в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) и подсчитывали в камере Горяева.

Активацию Т-клеток оценивали по экспрессии молекул CD38 и HLA-DR методом проточной цитометрии (FACSCalibur, Becton Dickinson) с применением моноклональных антител CD3-FITC, CD4-PE, CD8-PE, CD38-PE/Cy5, HLA-DR-APC и соответствующих изотипических контролей (BioLegend). Клетки,

одновременно несущие маркеры CD38 и HLA-DR, определяли как активированные.

Циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) выделяли методом преципитации в полиэтиленгликоле-6000 (Merck) после отделения плазмы крови центрифугированием (3000 об./мин, 10 мин). Для дифференцировки комплексов по размерам использовали две концентрации полимера – 3 и 4%. После отмывания ЦИК осадок ресуспензировали в 200 мкл забуференного фосфатами физиологического раствора (рН 7,4). В составе выделенных преципитатов определяли содержание иммуноглобулинов классов G, M и A методом количественной турбидиметрии согласно прилагаемой инструкции (Chronolab).

С целью создания модельных иммунных комплексов для стимуляции клеток использовали планшет из коммерческого набора реагентов для выявления антител к ВИЧ методом иммуноферментного анализа (НПО «Диагностические системы»). На поверхности лунок планшета производителем была сорбирована смесь рекомбинантных антигенов: ВИЧ-1 (p24gag, gp41env, gp120env, p31pol), мозаичный рекомбинантный антиген ВИЧ-1 группы O (p17/24/gp120-gp41), ВИЧ-2 (gp32env, gp36env). Для формирования иммунных комплексов в лунку вносили 100 мкл пулированного образца плазмы крови ВИЧ-инфицированных лиц, содержащей противовирусные антитела (проба «антиген+, антитела+»). В контрольные лунки добавляли 100 мкл пулированного образца плазмы крови ВИЧ-негативных добровольцев (проба «антиген+, антитела-») или 100 мкл раствора Хенкса (Sigma-Aldric) – проба «антиген+». Планшет инкубировали при 37°C в течение часа. Перед внесением мононуклеарных клеток лунки планшета пятикратно промывали раствором Хенкса.

Взаимодействие клеток с модельными иммунными агрегатами оценивали по генерации активных форм кислорода в люминолзависимой хемилюминесценции. В каждую лунку планшета с модельными комплексами вносили 4×10^5 мононуклеарных клеток здоровых людей и раствор люминола (10 мкМ, Fluka). Объем лунки доводили до 100 мкл раствором Хенкса. Измерение интенсивности свечения проводили при 37°C в течение 20 мин в динамическом режиме на микропланшетном люминометре (Luminoskan Ascent). Интервал между измерениями составлял одну минуту. Полученные результаты обрабатывали с помощью прилагающегося к прибору программного обеспечения. Вычисляли площадь под кривой люминесценции, результат выражали в виде интегральных значений – relative luminescence light units (RLU).

Активацию моноцитов (CD14⁺), стимулированных комплексами «антиген-антитело», оценивали методом проточной цитометрии по внутриклеточной экспрессии интерлейкина-6. В лунки планшета с модельными иммунными комплексами вносили 5×10^5 клеток здоровых доноров в 300 мкл среды RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), содержащей 20мМ HEPES и 2мМ

L-глутамин, 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Thermo Fisher Scientific), 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Thermo Fisher Scientific). Пробы культивировали (5% CO₂, влажная камера, 37°C) в течение 24 часов. За четыре часа до окончания инкубации в лунки вносили раствор брэфелдина А (5 мкг/мл, BioLegend). Внутриклеточное определение интерлейкина-6 в популяции моноцитов проводили после фиксации и пермеабелизации клеток (буферы BioLegend) с использованием моноклональных антител CD14-FITC, IL-6-PE и изотипических контролей (BioLegend).

Полученные данные представлены в виде медиан и интерквартильных размахов (25–75-й перцентили). Достоверность различий определяли на основе критерия Манна–Уитни. Корреляционный анализ выполняли по методу Спирмена.

Результаты исследования

В крови всех обследованных присутствовали иммунные комплексы, содержавшие, в основном, иммуноглобулины G и M. Иммуноглобулины этих классов входили в состав крупных и небольших по размерам ЦИК. У ВИЧ-инфицированных концентрации ЦИК с обоими иммуноглобулинами значительно превышали соответствующие показатели здоровых лиц.

Содержание иммуноглобулина G в составе крупных комплексов (рис. 1, а) у ВИЧ-зараженных и здоровых людей отличалось статистически значимо: 314 мг/л (177,4–382,9 мг/л) и 124,1 мг/л (92,0–165,4 мг/л), соответственно. Кроме того, в крови ВИЧ-позитивных пациентов в высоких концентрациях присутствовали низкомолекулярные ЦИК, содержавшие иммуноглобулин G (рис. 1, б). Их уровень составил 685,1 мг/л (266,8–962,8 мг/л). У здоровых субъектов этот показатель был существенно ниже – 212,9 мг/л (124,4–247,2 мг/л).

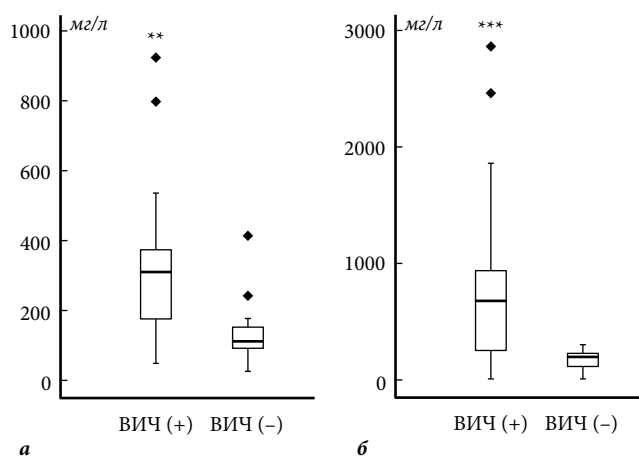


Рис. 1. Концентрация иммуноглобулина G в составе дифференцированных по размерам ЦИК у ВИЧ-инфицированных и здоровых людей:

а – крупные ЦИК, б – небольшие по размерам ЦИК. Для каждой группы показаны: медиана, интерквартильный размах и 10–90%-ный интервал (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

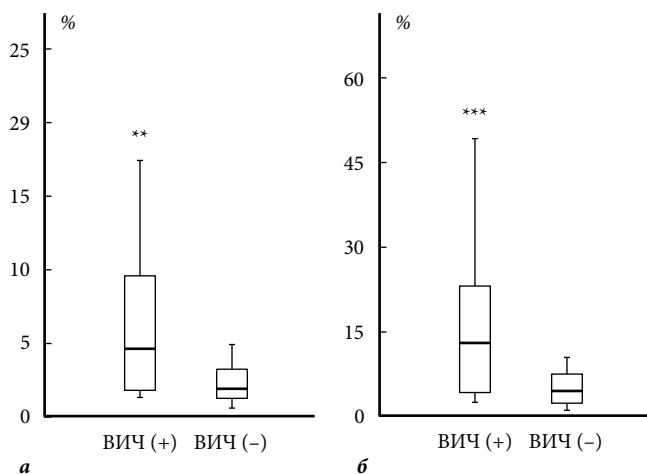


Рис. 2. Активация Т-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции: а – активированные Т-лимфоциты CD4+, б – активированные Т-лимфоциты CD8+. Для каждой группы показаны медиана, интерквартильный размах и 10–90%-ный интервал (** p<0,01, *** p<0,001).

При оценке ЦИК, содержавших иммуноглобулин М, было установлено, что у всех обследованных людей концентрация данного иммунного белка в составе агрегатов различных размеров была значительно ниже, чем иммуноглобулина G. Уровень крупных ЦИК, содержавших иммуноглобулин М, у ВИЧ-инфицированных и здоровых людей оказался равным 62,7 мг/л (41,6–82,5 мг/л) и 41,9 мг/л (39,5–44,6 мг/л), соответственно. У ВИЧ-инфицированных больных основная доля ЦИК, имевших в составе иммуноглобулин М, была представлена небольшими по размерам агрегатами. Их концентрация в 4,8 раза превышала соответствующий показатель неинфицированных лиц. Уровень иммуноглобулина М в составе низкомолекулярных ЦИК у ВИЧ-инфицированных и здоровых людей составил, соответственно, 130,1 мг/л (45,4–276,6 мг/л) и 27,2 мг/л (11,2–53,0 мг/л), p<0,001.

Доля активированных Т-клеток у пациентов с ВИЧ-инфекцией была выше по сравнению с контрольной группой. Относительное количество CD4+CD38+HLA-DR+ лимфоцитов (рис. 2, а) у ВИЧ-инфицированных и здоровых составило 4,6% (1,9–8,7%) и 1,7% (1,2–2,7%), p<0,01, соответственно. При оценке активированных Т-лимфоцитов CD8+ оказалось, что у всех обследованных их доля была выше, чем CD4+-клеток (рис. 2, б). У неинфицированных субъектов этот показатель рав-

нялся 4,1% (2,3–7,3%). При этом у инфицированных лиц процентное содержание CD8+-лимфоцитов, одновременно экспрессирующих молекулы CD38 и HLA-DR, было существенно выше: 12,9% (4,6–22,5%, p<0,001). Полученные данные свидетельствуют о том, что у обследованных нами ВИЧ-инфицированных пациентов Т-лимфоциты периферической крови находились в активированном состоянии.

Корреляционный анализ показал наличие связи между уровнем ЦИК и активацией Т-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных пациентов. Концентрации, как крупных, так и небольших по размерам комплексов, содержавших иммуноглобулин G, прямо коррелировали с относительным количеством активированных Т-лимфоцитов CD4+ и CD8+ (рис. 3). Кроме того, проверка связи активации Т-клеток с концентрацией ЦИК, в состав которых входил иммуноглобулин М, выявила прямую статистически значимую зависимость. Так, повышение содержания активированных Т-лимфоцитов CD4+ было ассоциировано с увеличением концентрации, как низкомолекулярных, так и крупных ЦИК: R=0,568 (p<0,01) и R=0,412 (p<0,05), соответственно. Для Т-клеток CD8+ определены аналогичные значимые связи: R=0,676 (p<0,001) и R=0,307 (p<0,05), соответственно.

Контакт мононуклеарных клеток с иммунными комплексами, в состав которых входят антигены ВИЧ и противовирусные антитела, сопровождался значительным усилением генерации клетками активных форм кислорода (рис. 4, а). В пробах, содержащих только антигены ВИЧ, показатель интенсивности хемилюминесценции был относительно невысоким и составил 3,2 RLU (0,5–4,8 RLU). Также установлено существенное увеличение силы свечения клеток, стимулированных иммунными агрегатами с антигенами ВИЧ и противовирусными антителами. Показатель хемилюминесценции в таких пробах составил 16,3 RLU (11,3–28,1 RLU, p<0,001). Однако в пробах, содержащих антигены ВИЧ без вирусспецифических антител, интенсивность свечения была почти в три раза ниже – 5,9 RLU (5,0–9,4 RLU, p<0,01). При этом сила свечения клеток в пробах, имевших в своем составе антигены ВИЧ, но не содержавших вирусспецифических антител, статистически значимо превышала соответствующее значение в пробах, где присутствовали только антигены ВИЧ.

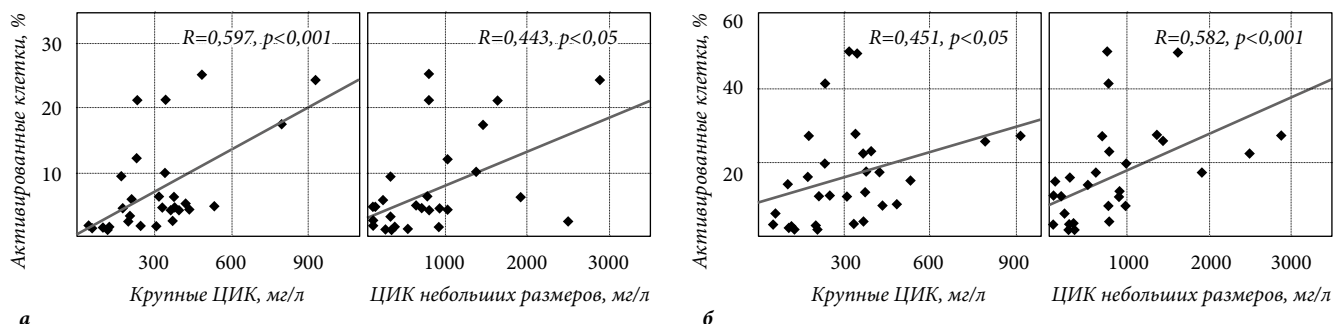


Рис. 3. Корреляции между уровнем ЦИК, содержавших иммуноглобулин G, и долей активированных Т-лимфоцитов: а – активированные CD4+-лимфоциты, б – активированные CD8+-лимфоциты.

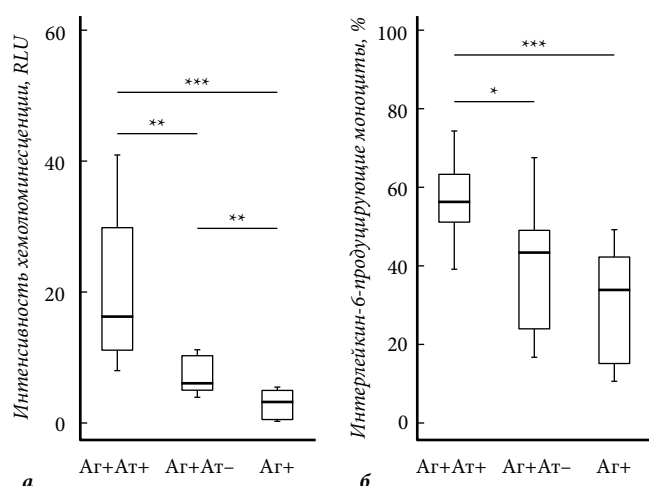


Рис. 4. Активация моноцитов периферической крови здоровых доноров, стимулированных иммунными комплексами, содержащими антигены ВИЧ (Аг) и противовирусные антитела (Ат): а – продукция активных форм кислорода, б – продукция интерлейкина-6. Аг+Ат+ – наличие в пробе антигенов ВИЧ и плазмы крови ВИЧ-зараженных, содержащей противовирусные антитела; Аг+Ат- – наличие в пробе антигенов ВИЧ и плазмы крови здоровых людей без вирусспецифических антител; Аг+ – наличие в пробе только антигенов ВИЧ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Продукция клетками интерлейкина-6 была отмечена во всех пробах, независимо от наличия или отсутствия комплексов «антиген–антитело» (рис. 4, б). При этом уровень синтеза цитокина существенно возрастал при их стимуляции иммунными агрегатами. Доля моноцитов, продуцирующих интерлейкин-6, в пробах, содержащих антигены ВИЧ и противовирусные антитела, и в пробах, содержащих только антигены без вирусспецифических антител, составила, соответственно, 55,8% (51,0–61,8%) и 43,1% (24,7–48,3%), $p < 0,05$. Относительное количество клеток, продуцирующих интерлейкин-6, стимулированных только антигенами ВИЧ было значимо ниже: 33,4% (15,4–40,7%).

Обсуждение полученных данных

Известно, что иммунная активация в значительной мере определяет прогрессирование заболевания у ВИЧ-инфицированных пациентов. Исходя из того, что в активированном состоянии находятся различные иммунокомпетентные клетки [10, 12], ее причиной, по-видимому, служат разнообразные факторы. Мы предположили, что комплексы «антиген–антитело» могут быть еще одним стимулятором иммунитета при ВИЧ-инфекции.

Иммунные комплексы постоянно присутствуют в кровотоке ВИЧ-инфицированных пациентов и более чем 80% случаев в их составе имеется иммуноглобулин G [11]. Проведенное нами определение ЦИК у ВИЧ-позитивных больных показало наличие в крови высоких концентраций комплексов, содержащих иммуноглобулины классов G и M. Более того, впервые выявлена прямая зависимость между концентрацией ЦИК и относительным количеством активированных Т-лимфоцитов, что может свидетельствовать о наличии *in vivo* взаимосвязи между комплексами «антиген–ан-

титело» и активацией Т-клеток. Взаимодействие с иммунными комплексами реализуется через находящиеся на поверхности клетки рецепторы к Fc-фрагментам антител [14, 15]. Эти рецепторы широко представлены на моноцитах, макрофагах, дендритных клетках и, как правило, не присутствуют на поверхности Т-лимфоцитов (за исключением $\gamma\delta$ -клеток) [7, 8]. Это предполагает, что активирующий эффект иммунных комплексов может быть опосредованным и реализоваться, в том числе, через клетки врожденного иммунитета.

Мы показали, что взаимодействие мононуклеарных клеток с комплексами «антигены–антитела против ВИЧ» приводит к усилению генерации кислорода и существенному увеличению доли CD14⁺-клеток, синтезирующих интерлейкин-6. Таким образом, установлено, что иммунные комплексы способны стимулировать иммунокомпетентные клетки и, по-видимому, могут быть еще одним фактором активации иммунитета при ВИЧ-инфекции.

Выводы

1. В кровотоке ВИЧ-инфицированных пациентов иммунные комплексы присутствуют в крайне высоких концентрациях.
2. Концентрация ЦИК прямо связана с активацией Т-лимфоцитов *in vivo*.
3. Иммунные комплексы, содержащие антигены ВИЧ и противовирусные антитела, способны активировать клетки врожденного иммунитета.

Работа выполнена в рамках государственного задания (номер госрегистрации темы: 01201353248).

Литература / References

1. Anderson C.F., Mosser D.M. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage // *J. Leuk. Biology.* 2002. Vol. 72, No. 1. P. 101–106.
2. Bastidas S., Graw F., Smith M.Z. [et al.]. CD8⁺ T cells are activated in an antigen-independent manner in HIV-infected individuals // *J. Immunol.* 2014. Vol. 192, No. 4. P. 1732–1744.
3. Biancotto A., Grivel J.C., Iglehart S.J. [et al.]. Abnormal activation and cytokine spectra in lymph nodes of people chronically infected with HIV-1 // *Blood.* 2007. Vol. 109, No. 10. P. 4272–4279.
4. Brenchley J.M., Price D.A., Schacker T.W. [et al.]. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection // *Nat. Med.* 2006. Vol. 12, No. 12. P. 1365–1371.
5. Catalfamo M., Wilhelm C., Tcheung L. [et al.]. CD4 and CD8 T cell immune activation during chronic HIV infection: roles of homeostasis, HIV, type I IFN, and IL-7 // *J. Immunol.* 2011. Vol. 186, No. 4. P. 2106–2116.
6. Eggena M.P., Barugahare B., Jones N. [et al.]. Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune activation // *J. Immunol.* 2005. Vol. 174, No. 7. P. 4407–4414.
7. Garcia-Garcia E., Rosales C. Fc receptor signaling in leukocytes: Role in host defense and immune regulation // *Current Immunology Reviews.* 2009. Vol. 5. P. 227–242.
8. Guillemins M., Bruhns P., Saeys Y. [et al.]. The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages // *Nat. Rev. Immunol.* 2014. Vol. 14, No. 2. P. 94–108.
9. Hazenberg M.D., Otto S.A., van Benthem B.H. [et al.]. Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS // *AIDS.* 2003. Vol. 17, No. 13. P. 1881–1888.
10. Kuri-Cervantes L., de Oca G.S., Avila-Rios S. [et al.]. Activation of NK cells is associated with HIV-1 disease progression // *J. Leukoc. Biol.* 2014. Vol. 96, No. 1. P. 7–16.

11. Liu P., Overman R.G., Yates N.L. [et al.]. Dynamic antibody specificities and virion concentrations in circulating immune complexes in acute to chronic HIV-1 infection // *J. Virol.* 2011. Vol. 85, No. 21. P. 11196–11207.
12. Moir S., Fauci A.S. B cells in HIV infection and disease // *Nat. Rev. Immunol.* 2009. Vol. 9, No. 4. P. 235–245.
13. Paiardini M., Muller-Trutwin M. HIV-associated chronic immune activation // *Immunological Reviews.* 2013. Vol. 254. P. 78–101.
14. Rosales C. Fc-gamma receptor heterogeneity in leukocyte functional responses // *Front. Immunol.* 2017. Vol. 8. P. 280.
15. Tanaka M., Krutzik S.R., Sieling P.A. [et al.]. Activation of Fc RI on monocytes triggers differentiation into immature dendritic cells that induce autoreactive T cell responses // *J. Immunol.* 2009. Vol. 183. P. 2349–2355.

Поступила в редакцию 06.09.2018.

IMMUNE COMPLEXES AND THEIR ROLE IN ACTIVATION OF IMMUNITY IN HIV-INFECTION

L.B. Korolevskaya¹, E.V. Saydakova¹, K.V. Shmagel¹, N.G. Shmagel^{1,2}

¹Perm Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (13 Goleva St. Perm 614081 Russian Federation), AIDS Prevention Centre (21 Arhitektora Sviyazeva St. Perm 614088 Russian Federation)

Objective. Immune activation is the main predictor of the progression of infection caused by the human immunodeficiency virus (HIV). The reasons remain incomprehensible and, probably, can be multifactorial. We suggest that immune complexes are also capable of stimulating immunocompetent cells.

Methods. We examined 30 HIV-infected patients who had concentrations of circulating immune complexes and the relative amount of activated T-lymphocytes. *In vitro* interaction of mononuclear cells of peripheral blood of uninfected donors with immune complexes containing HIV-antigens and antiviral antibodies.

Results. It was found that the concentration of circulating immune complexes is directly related to the activation of T-lymphocytes. It has been shown that the interaction of mononuclear cells of healthy donors with immune complexes leads to a significant increase in the proportion of CD14⁺ monocytes producing interleukin-6 and to enhance the production of reactive oxygen species.

Conclusions. Immune complexes containing HIV-antigens and antiviral antibodies are able to activate immunocompetent cells. Such complexes may be another factor in the activation of immunity in HIV-infection.

Keywords: human immunodeficiency virus, immunocompetent cells activation, circulating immune complexes, activated T-lymphocytes

Pacific Medical Journal, 2018, No. 4, p. 41–45.

УДК 616–005.8–089.819.843–089.168.1–06:616.153.96

DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2018.4.45–48

Анализ показателей матричной металлопротеиназы-9, тканевого ингибитора матричных металлопротеиназ 1-го типа и их комплекса у пациентов с острым инфарктом миокарда, подвергшихся чрескожным коронарным вмешательствам

Н.И. Грачев¹, В.Е. Красников¹, Е.П. Турмова¹, Е.В. Маркелова¹, В.Ю. Рублев², С.А. Назаренко¹

¹Тихоокеанский государственный медицинский университет (690002, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2),

²Приморская краевая клиническая больница № 1 (690091, г. Владивосток, ул. Алеутская, 57)

Обсуждается роль белков острой фазы, влияющих на состояние межклеточного матрикса. Представлен анализ содержания матричной металлопротеиназы-9, тканевого ингибитора матричных металлопротеиназ 1-го типа и их комплекса в сыворотке крови пациентов до и после чрескожных коронарных вмешательств. Показана возможность использования сывороточной концентрации матричной металлопротеиназы-9 (426,8–978,4 нг/мл), как предиктора ранних послеоперационных осложнений у пациентов с острым инфарктом миокарда, подвергшихся чрескожным коронарным вмешательствам.

Ключевые слова: протеиназы внеклеточного матрикса, коронарный атеросклероз, осложнения эндоваскулярных вмешательств, ROC-анализ

Сердечно-сосудистые заболевания занимают первое место в мире по смертности и инвалидизации. Ишемическая болезнь сердца и, в частности, ее крайнее проявление – острый инфаркт миокарда (ОИМ) лидирует по данным показателям среди этих нозологий [7]. Столь высокая социальная значимость острых нарушений коронарного кровотока диктует актуальность непрерывного изучения его патофизиологических механизмов. Современные медицинские технологии позволяют значительно улучшить качество оказываемой помощи пациентам с ОИМ. Развитие кардиологии сегодня невозможно представить без

эндоваскулярных методов лечения, а именно – чрескожных коронарных вмешательств (ЧКВ). Только в Российской Федерации за 2015 г. выполнено 202 217 стентирований коронарных артерий, и с каждым годом количество подобных операций увеличивается [5]. Считается, что ЧКВ можно считать «золотым стандартом» лечения острого коронарного синдрома, в том числе и ОИМ. Неблагоприятные события и осложнения эндоваскулярных вмешательств, которые определяют прогноз заболевания, остаются нерешенной проблемой интервенционной кардиологии, их механизмы с точки зрения иммунобиохимических процессов обсуждаются во всем мире. Уже не вызывает сомнений тот факт, что атеросклероз по

Грачев Никита Игоревич – аспирант кафедры нормальной и патологической физиологии ТГМУ; e-mail: nik-vgmu@yandex.ru

своей природе – воспалительный процесс, что в свою очередь определяет необходимость более глубокого и детального изучения иммунопатогенеза ишемических болезней сердца. В качестве прогностических факторов осложненного течения послеоперационного периода интервенционных коронарных вмешательств активно обсуждается роль белков острой фазы, влияющих на состояние межклеточного матрикса: матриксной металлопротеиназы-9 (ММП-9), тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ 1-го типа (ТИМП-1) и комплекса ММП-9/ТИМП-1 [6].

В ряде исследований матриксные металлопротеиназы рассматриваются в качестве независимых маркеров краткосрочного прогноза при остром коронарном синдроме, ассоциированных с высоким риском повторных ишемических событий [4]. Также обсуждается роль повышенной экспрессии матриксных металлопротеиназ 2, 3, 7 и 9 в развитии фатальных и нефатальных осложнений в течение года после перенесенного инфаркта миокарда [2]. Существенный вклад в изучение роли этих внеклеточных протеиназ у больных острым коронарным синдромом внесли W. Phatharajaree et al. [13], B.J. Jefferis et al. [11] и J. Wang et al. [14]. В работе Т.Б. Печериной и др. (2013) была показана госпитальная динамика матриксных металлопротеиназ в сыворотке крови с максимальными их концентрациями на 12-е сутки инфаркта миокарда с подъемом сегмента ST, при этом более высокие концентрации протеиназ регистрировались у пациентов в возрасте 65 лет и старше, а также при наличии в анамнезе курения, стенокардии, инфаркта миокарда, при отсутствии на догоспитальном этапе приема статинов и при наличии класса острой сердечной недостаточности более II по Killip [3].

Однако до сих пор нет убедительных данных о прогностической ценности уровня матриксных металлопротеиназ в отношении риска развития сердечно-сосудистых событий после перенесенного инфаркта миокарда у лиц, подвергшихся чрескожным коронарным вмешательствам, что определяет актуальность новых исследований возможности использования компонентов этой ферментной системы для эффективной риск-стратификации у пациентов с ОИМ.

Важным эндогенным регулятором общей активности ММП являются тканевые ингибиторы ММП [9]. Как правило, они находятся в тонком балансе с матриксными металлопротеиназами. Сообщалось, что нарушения этого баланса возникают при ряде сердечных патологий [10]. Например, на конечной стадии кардиомиопатии повышенная активность матриксных металлопротеиназ сопровождалась уменьшением экспрессии их тканевых ингибиторов 1-го, 3-го и 4-го типов [8].

Так как определенных выводов в контексте изучения комплексного и индивидуального вклада каждого маркера в качестве прогностических факторов ранних и поздних осложнений после ЧКВ у пациентов с ОИМ на сегодняшний день нет, нами были включены в исследование наиболее обсуждаемые в научном сообществе показатели.

Материал и методы

Набор материала и оценка отдаленных результатов проводились с 2013 до 2017 г. на базе ПМКБ № 1 г. Владивостока. В состав исследуемой группы вошло 86 пациентов с ОИМ обоюбого пола в возрасте от 41 до 74 лет. Лабораторные исследования проводились на базе ТГМУ. Всем пациентам сразу после госпитализации выполнялось ЧКВ. Эффект операции определялся ангиографически в течение 12 месяцев после процедуры. Группа контроля – 30 практически здоровых лиц сопоставимого возраста. Забор крови проводился непосредственно перед операцией и на 2-е и 7-е сутки после вмешательства. Определение сывороточных уровней ММП-9, ТИМП-1 и комплекса ММП-9/ТИМП-1 осуществлялось с помощью метода твердофазного иммуноферментного анализа с использованием специфических реактивов R&D Diagnostics Inc. (США).

Пациенты были разделены на группы по характеру течения послеоперационного периода:

1-я группа – 62 человека с «гладким» течением послеоперационного периода;

2-я группа – 13 человек с ранними осложнениями ЧКВ (нестабильность гемодинамических показателей, жизнеугрожающие нарушения ритма);

3-я группа – 11 человек с поздними осложнениями ЧКВ (рестеноз внутри стента, стенозы *de-novo* и повторные реваскуляризации на целевом сосуде).

Для характеристики количественных переменных с ненормальным распределением использовались медиана (Me) и значения 25-го и 75-го квартилей (Q_{25} – Q_{75}). Данные сравнивались U-тестом Манна–Уитни. Логистический регрессионный анализ был проведен для определения предикторов осложнений. Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с использованием программного обеспечения SPSS 20.0. Статистически достоверными считали различия при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты исследования

Концентрация ММП-9 в сыворотке крови у пациентов с ОИМ в полтора раза превышала таковую в группе здоровых лиц, как до операции, так и на 2-е и 7-е сутки после нее. Сывороточный уровень ММП-9 нарастал ко 2-м суткам и снижался к концу первой недели, не достигая, однако, референсных значений (табл. 1).

У пациентов с осложнениями в раннем периоде после ЧКВ определялись более высокие уровни ММП-9, чем в 1-й группе на 7-е сутки после процедуры. На всех этапах исследования концентрации ММП-9 в 3-й группе пациентов были выше, чем при гладком течении послеоперационного периода. При сравнении 2-й и 3-й групп (с ранними и отдаленными осложнениями) статистически значимые различия были выявлены только с показателями до операции (табл. 2).

Концентрация ТИМП-1 в сыворотке крови пациентов основной группы до начала исследования

Таблица 1

Содержание ММП-9, ТИМП-1 и комплекса ММП-9/ТИМП-1 в сыворотке крови 86 пациентов с ОИМ до и после ЧКВ

Показатель		Содержание в сыворотке крови, нг/мл			
		Пациенты с ОИМ		Контроль	
		Ме	Q ₂₅ -Q ₇₅	Ме	Q ₂₅ -Q ₇₅
ММП-9	до ЧКВ	438,3 ^{а,б}	253,1-620,1	274,4	209,0-324,0
	2-е сутки	467,5 ^б	464,2-551,7		
	7-е сутки	413,4	328,4-502,3		
ТИМП-1	до ЧКВ	265,3 ^б	138,7-297,2	220,3	139,3-241,3
	2-е сутки	270,6 ^б	197,3-305,1		
	7-е сутки	292,1	271,2-376,3		
ММП-9/ ТИМП-1	до ЧКВ	9,8	4,3-11,3	11,9	7,2-14,1
	2-е сутки	9,7	5,5-10,1		
	7-е сутки	8,9	7,2-10,8		

^а Разница с показателем на «2-е сутки» (после ЧКВ) статистически значима.

^б Разница с показателем на «7-е сутки» (после ЧКВ) статистически значима.

статистически значимо превышала показатели контроля. При этом был зафиксирован относительно стабильный уровень ТИМП-1 до ЧКВ и на 2-е сутки с последующим ростом его к концу первой недели послеоперационного периода (табл. 1). До ЧКВ содержание ТИМП-1 в 3-й группе пациентов было выше, чем в группе с ранними осложнениями. До вмешательства концентрация ТИМП-1 в сыворотке крови представителей 1-й группы статистически значимо не отличалась от таковых в группах с осложнениями. В динамике сывороточный уровень ингибитора увеличивался у пациентов всех трех групп основного контингента. После операции различий в уровнях ТИМП-1 между этими группами не регистрировалось (табл. 2).

Содержание комплекса ММП-9/ТИМП-1 в сыворотке крови пациентов с ОИМ до, и после ЧКВ было значимо выше, чем в контроле (табл. 1), но динамики этого показателя на протяжении всех этапов наблюдения не зарегистрировано (табл. 2).

Обсуждение полученных данных

Настоящее исследование показало, что сывороточные уровни ММП-9 и ТИМП-1 у пациентов с ОИМ значительно выше, чем у здоровых лиц, в то время как значения комплекса ММП-9/ТИМП-1, напротив, ниже, чем в группе контроля. Это доказывает роль белков острой фазы, влияющих на состояние межклеточного матрикса в иммунопатогенезе атеросклероза и механизмах разрыва атеросклеротической бляшки [1]. Вероятно, дисбаланс изученных показателей напрямую связан с трансформацией стабильных бляшек с хорошо выраженной соединительнотканной капсулой в нестабильные, служащие пусковым механизмом развития ОИМ [5].

Интересно отметить, что динамика концентрации в сыворотке крови ММП-9 и ТИМП-1 после ВКЧ имела отличную динамику: к 7-м суткам уровень ММП-9 повышался, в то время как уровень ТИМП-1 снижался. Это можно объяснить реакцией на имплантацию стента, которая происходит посредством агрессивной баллоной ангиопластики, травмирующей интиму артерии [12].

После комплексного изучения динамики показателей белков острой фазы, влияющих на состояние межклеточного матрикса, в группах с различным течением послеоперационного периода была выполнена процедура логистической регрессии с целью выявления прогностических маркеров осложнений ЧКВ. Несмотря на наличие различий в группах осложненного и «гладкого» послеоперационного периода был выявлен только один статистически значимый маркер риска ранних осложнений. Так, концентрация ММП-9 на 7-е сутки после вмешательства обладала прогностической ценностью для оценки вероятности ранних осложнений (точки отсечения – 426,8–978,4 нг/мл). При

Таблица 2

Содержание ММП-9, ТИМП-1 и комплекса ММП-9/ТИМП-1 в сыворотке крови 86 пациентов с ОИМ с различными вариантами течения послеоперационного периода

Показатель		Содержание в сыворотке крови, нг/мл					
		1-я группа		2-я группа		3-я группа	
		Ме	Q ₂₅ -Q ₇₅	Ме	Q ₂₅ -Q ₇₅	Ме	Q ₂₅ -Q ₇₅
ММП-9	до ЧКВ	473,4 ^{а,б}	417,1-529,8	503,5 ^{а,г}	382,7-624,2	489,3 ^г	276,3-702,5
	2-е сутки	428,5 ^б	401,2-555,8	504,7 ^{б,в}	444,1-565,4	498,1 ^{б,г}	382,1-614,0
	7-е сутки	392,1	361,8-422,4	437,5 ^г	354,4-520,6	417,7 ^г	285,4-550,0
ТИМП-1	до ЧКВ	269,8 ^{а,б}	265,7-274,0	257,0 ^{а-г}	237,9-276,0	277,4 ^б	247,9-306,8
	2-е сутки	273,8 ^б	267,0-280,6	271,9 ^б	259,8-284,0	279,1 ^б	258,3-299,8
	7-е сутки	293,6	287,4-299,7	293,8	278,6-308,9	302,9	282,4-323,4
ММП-9/ТИМП-1	до ЧКВ	9,6	9,4-9,8	9,9	9,7-10,1	9,8	9,7-9,8
	2-е сутки	9,7	9,5-9,8	9,8	9,6-10,1	9,8	9,4-10,2
	7-е сутки	8,7	8,7-9,0	9,0	8,8-9,2	8,8	8,5-9,0

Примечание: разница с группой контроля (см. табл. 1) по всем показателям статистически значима.

^а Разница с показателем на «2-е сутки» (после ЧКВ) внутри группы статистически значима.

^б Разница с показателем на «7-е сутки» (после ЧКВ) внутри группы статистически значима.

^в Разница с 3-й группой по данному энзимы статистически значима.

^г Разница с 1-й группой по данному энзимы статистически значима.

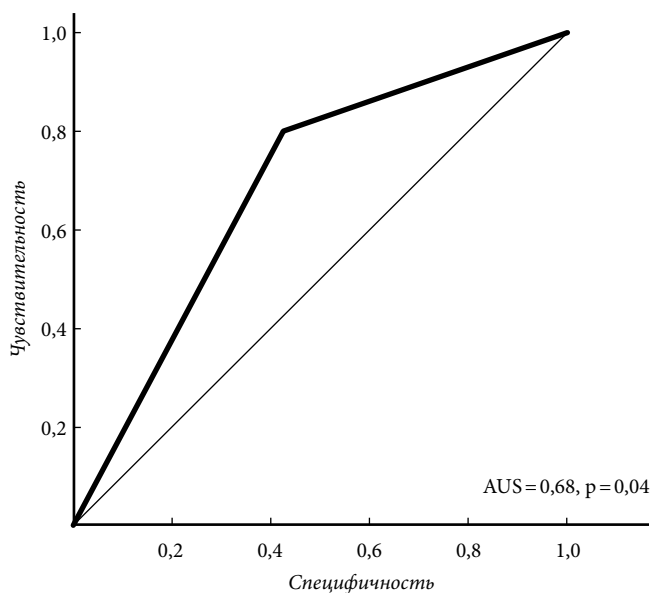


Рис. ROC-анализ концентрации ММП-9 на 7-е сутки после ЧВК у пациентов с ОИМ (AUS – area under ROC curve).

этом, построенная для определения диагностической точности прогностической модели площадь под ROC-кривой (рис.) составила 0,68 ($\chi^2=9,77$, $df=1$, $p=0,01$).

Литература / References

- Ахмедов В.А., Долгих В.Т., Наумов Д.В., Нечипоренко Н.А. Клиническое значение матричных металлопротеиназ при сердечно-сосудистой патологии // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2013. № 2. С. 77–79. Akhmedov V.A., Dolgikh V.T., Naumov D.V., Nechiporenko N.A. The clinical significance of matrix metalloproteinases in heart and vascular pathology // Pathological Physiology and Experimental Therapy. 2013. No. 2. P. 77–79.
- Говорин А.В., Рацина Е.В., Соколова Н.А. Изменения показателей матричных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов при различных формах ишемической болезни сердца // Сибирский мед. журн. (Иркутск). 2014. Т. 124, № 1. С. 27–32. Govorin A., Ratsina E., Sokolova N. Changes in matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in different forms of ischemic heart disease // Siberian Medical Journal (Irkutsk). 2014. Vol. 124, No. 1. P. 27–32.
- Печерина Т.В., Груздева О.В., Кашталап В.В., Барбараш О.Л. Роль матричных металлопротеиназ в оценке прогноза у больных инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST в период пребывания в стационаре // Кардиология. 2013. Т. 53, № 6. С. 18–24. Pecherina T.V., Gruzdeva O.V., Kashtalap V.V., Barbarash O.L. The role of matrix metalloproteinases in assessment of prognosis in patients with ST-elevation myocardial infarction during hospital stay // Kardiologiya. 2013. Vol. 53, No. 6. P. 18–24.
- Пономарь Е.Г., Сыркин А.Л., Гусев Д.Е., Андреев Д.А. Маркеры воспаления и долгосрочный прогноз у больных с острым коронарным синдромом и стабильной формой ишемической болезни сердца // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. 2011. Т. 4, № 6. С. 10–15. Ponomar' E.G., Syrkin A.L., Gusev D.E., Andreev D.A. Inflammation markers and long-term prognosis in patients with acute coronary syndrome and stable coronary heart disease // Cardiology and Cardiovascular Surgery. 2011. Vol. 4, No. 6. P. 10–15.
- Рентгенэндоваскулярная хирургия: национальное руководство в 4 т. Т. 2. Ишемическая болезнь сердца / под ред. Б.Г. Алексяна. М.: Литтерра, 2017. 792 с. Endovascular surgery: National Manual. Vol. 2. Ischemic heart disease / ed. by B.G. Aleksyan. Moscow: Litterra, 2017. 792 p.
- Рогова Л.Н., Шестернина Н.В., Замечник Т.В., Фастова И.А. Матричные металлопротеиназы, их роль в физиологических и патологических процессах // Вестник новых медицинских технологий. 2011. Т. 18, № 2. С. 86–89. Rogova L.N., Shesternina N.V., Zamechnik T.V., Fastova I.A. Matrix metalloproteinases, their role in physiological and pathological processes // Journal of New Medical Technologies. 2011. Vol. 18, No. 2. P. 86–89.
- Силаев А.А., Турмова Е.П., Маркелова Е.В. [и др.]. Анализ эффективности цитокинотерапии в послеоперационном периоде у пациентов с коронарным атеросклерозом // Тихоокеанский медицинский журнал. 2013. № 3. С. 18–21. Silaev A.A., Turmova E.P., Markelova E.V. [et al.]. Assessing efficiency of cytokine therapy during post-operative period in patients with coronary atherosclerosis // Pacific Medical Journal. 2013. No. 3. P. 18–21.
- Bigg H.F., Rowan A.D., Barker M.D., Cawston T.E. Activity of matrix metalloproteinase-9 against native collagen types I and III // FEBS J. 2007. Vol. 274, No. 5. P. 1246–1255.
- Dinh W., Scheffold T., Bansemir L. [et al.]. Increased serum levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in patients with acute myocardial infarction // International Heart Journal. 2009. Vol. 50, No. 4. P. 421–431.
- Furenes E.B., Opstad T.B., Solheim S. [et al.]. The influence of autologous bone marrow stem cell transplantation on matrix metalloproteinases in patients treated for acute ST-elevation myocardial infarction // Mediators Inflamm. 2014. doi: 10.1155/2014/385901.
- Jefferis B.J., Whincup P., Welsh P. [et al.]. Prospective study of matrix metalloproteinase-9 and risk of myocardial infarction and stroke in older men and women // Atherosclerosis. 2010. Vol. 208, No. 2. P. 557–563.
- Opstad T.B., Arnesen H., Pettersen A.A. [et al.]. The MMP-9-1562 C/T polymorphism in the presence of metabolic syndrome increases the risk of clinical events in patients with coronary artery disease // PLoS One. 2014. Vol. 9, No. 9. P. e106816.
- Phatharajaree W., Phrommintikul A., Chattapakorn N. Matrix metalloproteinases and myocardial infarction // Can. J. Cardiol. 2007. Vol. 23, No. 9. P. 727–733.
- Wang Y., Fu R., Wang Z. [et al.]. Assessing the quality of care for patients with acute myocardial infarction in China // Clin. Cardiol. 2015. Vol. 38, No. 6. P. 327–332.

Поступила в редакцию 06.09.2018.

ANALYSIS OF MATRIX METALLOPEPTIDASE 9 (MMP-9), TISSUE INHIBITOR OF METALLOPROTEINASES TYPE 1 (TIMP-1) AND MMP-9/TIMP-1 COMPLEX IN PATIENTS WITH ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION AFTER PERCUTANEOUS CORONARY INTERVENTIONS

N.I. Grachev¹, V.E. Krasnikov¹, E.P. Turmova¹, E.V. Markelova¹, V.Yu. Rublev², S.A. Nazarenko¹

¹ Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 690002 Russian Federation), ² Primorye Regional Clinical Hospital No. 1 (57 Aleutskaya St. Vladivostok 690091 Russian Federation)

Objective. The objective of the study was to identify additional markers of complications of percutaneous coronary interventions in patients with acute myocardial infarction

Methods. We analyzed the serum content MMP-9, TIMP-1, and MMP-9/TIMP-1 complex in 86 patients aged 41–74 with acute myocardial infarction before and after percutaneous coronary intervention.

Results. The serum levels of MMP-9 and TIMP-1 in patients with acute myocardial infarction are significantly higher than in healthy individuals, while the MMP-9/TIMP-1 complex, in contrast, is lower than in the control group. The dynamics of serum concentration of MMP-9 and TIMP-1 after the intervention had a different picture: by the 7th day, the level of MMP-9 increased, while the TIMP-1 values, on the contrary, decreased.

Conclusions. Our study proved the possibility of using the serum concentration of MMP-9 (426.8–978.4 ng/ml) as a predictor of early postoperative complications in patients with acute myocardial infarction after percutaneous coronary interventions.

Keywords: extracellular matrix proteinase, coronary atherosclerosis, complications of endovascular interventions, ROC curve analysis

УДК 615.37:577.114:582.272

DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2018.4.49-52

Клеточные и молекулярные механизмы иммуномодулирующего действия фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens*

Т.С. Запорожец¹, А.К. Гажа¹, Т.Н. Звягинцева², О.С. Маляренко², Н.Н. Беседнова¹

¹ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова (690087, г. Владивосток, ул. Сельская, 1), ² Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН (690022, г. Владивосток, пр-т 100-летия Владивостока, 159/2)

Фукоиданы – водорастворимые, высокосульфатированные, разветвленные гомо- и гетерополисахариды, полученные из морских бурых водорослей – обладают свойствами миметиков природных лигандов белков-рецепторов, действуют как промоторы и ингибиторы биологических реакций, в том числе связанных с реализацией иммунного ответа и развитием воспаления. В настоящей работе представлены результаты изучения действия фукоидана из *Fucus evanescens* на процессы пролиферации и апоптоза лимфоцитов периферической крови человека. Фукоидан оказывал влияние на способность лимфоцитов к бласттрансформации в зависимости от степени пролиферативного потенциала клеток: при исходно низком уровне спонтанной пролиферации проявлял стимулирующее действие, при высоком – ингибировал пролиферацию. Направленность эффекта фукоидана различалась также в зависимости от исходного состояния клеток (покой или активация) и конечной концентрации полисахарида в среде культивирования. Заключается, что исходом активации лимфоцитов при действии на них митогена (фитогемагглютинин) и фукоидана может быть как пролиферация, так и апоптоз. Увеличение количества апоптотических клеток при внесении фукоидана в культуру лимфоцитов, активированных фитогемагглютинином, на высоте пролиферации может быть отражением суммации митогенных сигналов фукоидана и митогена.

Ключевые слова: сульфатированные полисахариды, активация лимфоцитов, пролиферация, апоптоз

Углеводы, участвующие в важнейших биологических процессах, считаются относительно неиспользованным источником лекарств, открывающим новые возможности терапевтического воздействия при процессах, в развитии которых они играют ключевую роль. К ним относятся воспаление, рак и инфекции. Потенциальная значимость углеводов-углеводных и углевод-белковых взаимодействий детерминирована присутствием на внешней поверхности клеток множества гликолигандных структур, образующих гликокаликс, а также различных типов мембраносвязанных углеводсвязывающих белков, которые расшифровывают гликокод и распознают определенные сахара [11]. Эти же компоненты присутствуют в растворимой форме в окружающей клетки среде и способны к аффинному связыванию с комплементарными мембранными гликорепцепторами. Общим признаком таких структур считается способность влиять на процессы внутриклеточной сигнализации.

В последнее время активно развиваются исследования, связанные с возможностью использования в качестве терапевтических средств сложных гликанов (полисахаридов), в том числе гетерополисахаридов. К их числу относятся фукоиданы – водорастворимые, высокосульфатированные, разветвленные гомо- и гетерополисахариды из морских бурых водорослей, где основным моносахаридным остатком служит L-фукоза [15]. Широкий спектр биологических свойств фукоиданов определяется их структурным сходством с гепарансульфат гликозаминогликанами, обнаруженными в базальных мембранах, во внеклеточном матриксе, а также на поверхности клеток в составе мембран [10]. Связывание гепарин/гепарансульфатов с другими

макромолекулами обеспечивает структурную организацию внеклеточного матрикса в соединительных тканях, контроль гомеостаза, регуляцию клеточного метаболизма, дифференцировки и агрегации клеток и др. и дает возможность модулировать влияние многих сигнальных молекул на клетку [13]. Фукоиданы, будучи природными миметиками гепарансульфат гликозаминогликанов, проявляют бифункциональные эффекты, выступая в качестве, как промоторов, так и ингибиторов биологических реакций, в том числе при реализации иммунного ответа и развитии воспаления [5, 10]. В механизмах иммуномодуляции ведущую роль играют процессы активации, пролиферации и дифференцировки лимфоцитов, межклеточные взаимодействия и сопутствующая продукция цитокинов. Вместе с тем, апоптоз – запрограммированная клеточная гибель – обеспечивает естественный механизм элиминации клеток, ограничивающий экспансию активированных клонов, развитие воспаления и аутоиммунных реакций [3]. Авторы публикаций о молекулярных связях между путями выживания и сигнальными апоптозными путями предполагают участие рецепторов смерти и их регуляторов в механизмах роста и дифференцировки, и рассматривают апоптоз и пролиферацию как альтернативные формы ответа клеток на стимуляцию [1, 4]. В этой связи изучение параметров основных гомеостатических систем – пролиферации и апоптоза – несет важную биологическую информацию и целесообразно для более полной характеристики веществ, перспективных для создания иммуномодулирующих лекарственных препаратов.

Ранее мы показали, что фукоидан из бурой водоросли *Fucus evanescens* наряду с противоопухолевыми, противовирусными, антикоагулянтными, свойствами обладает противовоспалительным,

иммуномодулирующим и апоптозрегулирующим действием [2, 7]. Цель настоящей работы заключалась в определении влияния фукоидана из *F. evanescens* на динамические процессы пролиферации и апоптоза лимфоцитов периферической крови человека.

Материал и методы

Фукоидан из бурой водоросли *F. evanescens* был выделен в соответствии с протоколом (патент WO 2005/014657 A1) и структурно охарактеризован, как описано ранее [14]. Анализ моносахаридного состава показал, что полисахарид содержал следующие моносахариды (%): Fuc – 79, Xyl – 7, Man – 2, Gal – 12; соотношение сульфатов: Fuc:SO₃, моль/моль – 1:(0,7–1).

Лимфоциты периферической крови здоровых доноров выделяли на градиенте плотности фиколл-верографина ($d = 1,077$), отмывали фосфатно-солевым буфером, доводили до концентрации 2×10^6 /мл полной ростовой средой, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 0,01M NEPES, 200мM L-глутамин, 10^{-5} M 2-меркаптоэтанола, 100 мг/мл гентамицина. Выход жизнеспособных клеток, оцениваемый по окраске трипановым синим, составлял более 90%. Клеточную взвесь 2×10^6 /мл в объеме 200 мкл засеивали в лунки 96-луночных планшетов и культивировали при 37°C в течение 96 часов в газовой среде с 5% CO₂. В качестве митогена использовали фитогемагглютинин (Sigma, США) в дозе 1 или 10 мкг/мл. По истечении 72 часов (на пике пролиферации) в лунки вносили фукоидан в изучаемых дозах и инкубировали 24 часа. По окончании инкубации исследовали количество апоптотических клеток цитофлуориметрическим методом измерения гиподиплоидной ДНК, окрашенной пропидиум йодидом (Sigma, США). Пролиферативную активность лимфоцитов оценивали по включению ³H-тимидина с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика Mark-III.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программы Statistica 6. Использовали описательную статистику с вычислением средних (M), их стандартных ошибок (m) и значимости различий между средними на основе t -критерия Стьюдента (p). При анализе взаимосвязи между переменными использовали коэффициент корреляции (r) Спирмена и коэффициент детерминации (R^2).

Результаты исследования

Фитогемагглютинин (ФГА) – Т-клеточный митоген, моделирует состояние активации лимфоцитов *in vitro* и обеспечивает возможность выяснения закономерностей действия исследуемых веществ на популяцию Т-клеток с максимальной приближенностью к условиям живого организма. В предварительных исследованиях мы установили модулирующее влияние фукоидана из *F. evanescens* на способ-

ность лимфоцитов периферической крови человека к бласттрансформации в зависимости от степени пролиферативного потенциала клеток: при исходно низком уровне спонтанной пролиферации полисахарид проявлял стимулирующее действие, при высоком – ингибировал пролиферацию. В дальнейшем, для выявления зависимости пролиферации лимфоцитов от дозы фукоидана использовали культуры клеток с низкой пролиферативной активностью. Фукоидан проявлял митогенные свойства, увеличивая спонтанную пролиферацию лимфоцитов в конечной концентрации от 1 до 100 мкг/мл. Направленность данного эффекта также различалась в зависимости от исходного состояния клеток (покой или активация), при этом комитогенное действие проявлялось в случае субоптимальной активации лимфоцитов ФГА (1 мкг/мл). В низких дозах (1 мкг/мл) фукоидан стимулировал, а в конечной концентрации 100 мкг/мл – подавлял митогенстимулированную пролиферацию лимфоидных клеток (табл.).

Уровень спонтанной фрагментации ДНК в культуре лимфоцитов составлял $11,5 \pm 1,4\%$. Через 96 часов после действия ФГА в конечной концентрации 10 мкг/мл регистрировалось значимое усиление апоптоза лимфоцитов, превышавшее его среднее исходное значение ($20,4 \pm 2,1\%$, $p = 0,007$) при концентрации клеток в культуре 5×10^6 /мл. Внесение фукоидана в культуру лимфоцитов на пике пролиферации в процессе ответа на ФГА (через 72 часа культивирования) в конечной концентрации 1 мкг/мл и 10 мкг/мл не изменяло ($24 \pm 2,9$ и $21,5 \pm 2\%$, соответственно), а в концентрации 100 мкг/мл значимо увеличивало количество апоптотических клеток до $47,5 \pm 6,8\%$.

При построении аппроксимирующих кривых зависимости уровней пролиферации и апоптоза от конечной концентрации фукоидана продемонстрировано, что в присутствии митогена (ФГА) использование минимальной и средней доз фукоидана сопровождалось усилением пролиферации и апоптоза (пролиферация оценивалась через 72 часа, апоптоз – через 96 часов культивирования) ($r = 0,68 \pm 0,18$, $p < 0,05$ при использовании дозы 10 мкг/мл; $r = 0,83 \pm 0,13$, $p < 0,01$ при использовании дозы 1 мкг/мл). В максимальной дозе

Таблица

Влияние фукоидана на спонтанную и митогениндуцированную пролиферацию лимфоцитов периферической крови

Вариант опыта	Доза, мкг/мл	Включение ³ H-тимидина					
		МИП ^а , имп./мин.			СП ^б , имп./мин.		
		$M \pm m$	$p^в$	ИС ^г	$M \pm m$	$p^д$	ИС ^г
Контроль	–	–	–	–	1634±173	–	–
ФГА	1	11193±950	–	–	–	0,000	–
	1	16229±1003	0,006	1,5	2124±224	0,130	1,3
	10	12213±876	0,192	1,1	2778±276	0,060	1,7
	100	7552±591	0,008	0,8	3300±292	0,003	2,0

^а Митоген-индуцированная пролиферация.

^б Спонтанная пролиферация.

^в Значимость различий по сравнению с опытом «ФГА».

^г Индекс стимуляции – отношение среднего значения пролиферации (имп./мин.) в опытных и контрольных культурах.

^д Значимость различий по сравнению с контролем (интактные клетки).

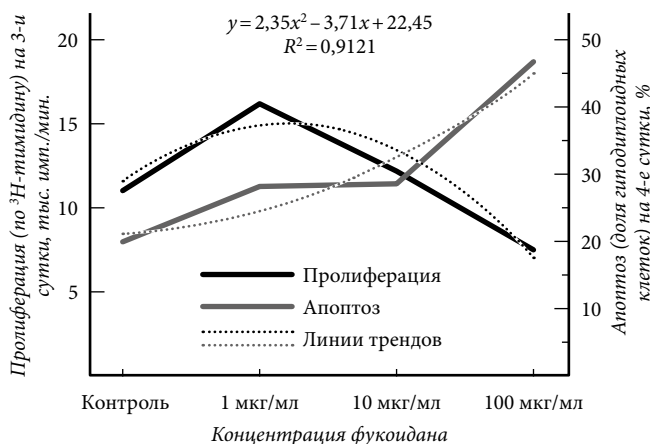


Рис. Эмпирические данные и аппроксимирующие кривые зависимости уровня пролиферации и апоптоза от конечной концентрации фукоидана в среде культивирования.

(100 мкг/мл) между выраженностью апоптотической реакции и пролиферативными процессами выявлена тесная отрицательная корреляционная связь ($r = -0,90 \pm 0,19$, $p < 0,01$): способность лимфоцитов к пролиферации снижалась, а количество апоптотических клеток увеличивалось. Выявленную закономерность наглядно иллюстрируют линии полиномиального тренда (рис.).

Обсуждение полученных данных

Основной принцип функционирования физиологических систем – поддержание биологической целостности организма. На клеточном уровне данный процесс реализуется за счет регуляторного влияния эфферентных сигналов, обеспечивающих сложное состояние равновесия между интегративными физиологическими процессами – пролиферацией, дифференцированием и программируемой клеточной гибелью. Иммунный ответ, сопряженный с активацией лимфоцитов, может приводить, в зависимости от ряда внешних и внутренних факторов, к двум взаимоисключающим исходам – пролиферации и апоптозу. Общность сигнальных путей, рецепторов роста и смерти детерминирована необходимостью обеспечения гибели клеток, подверженных всплескам быстрой и интенсивной пролиферации. Механизмы, контролирующие чувствительность Т-клеток к активационному апоптозу, до конца не ясны. Тем не менее, очевидно, что модуляция апоптоза Т-лимфоцитов осуществляется на нескольких уровнях, включая регуляцию апоптозиндуцирующих сигналов и их рецепторов, костимулирующих сигналов (цитокинов, гормонов, контактной стимуляции), вторичных сигнальных мессенджеров апоптоза (фосфатаз, киназ, транскрипционных факторов) и метаболических каскадов, вызывающих непосредственное повреждение клетки (активных форм кислорода, протеаз, нуклеаз и др.) [3, 4]. Как и при активации лимфоцитов, при апоптозе передача сигнала регулируется трансмембранной тирозин-фосфатазой CD45 [4, 6]. Ионы Ca^{2+} , играющие важнейшую роль в клеточной пролиферации, инициируют формирование пор в митохондриальных мембранах

и истечение апоптотических факторов из митохондрий. В реализации апоптоза участвует и ряд транскрипционных факторов, ответственных за выход клетки из фазы покоя в цикл или за продвижение по циклу (факторы Nur-77 и с-мус, NF-κB) [3]. При этом, с одной стороны, стимуляция лимфоцитов активирует транскрипционный фактор NF-κB, который опосредует экспрессию генов *TRAF-1*, *TRAF-2*, *cIAP-1* и *cIAP-2*, блокирующих активацию каспазы-8, ключевого инициатора апоптоза, и ингибирует апоптоз, с другой – классические рецепторы апоптоза (рецепторы к Fas, фактору некроза опухоли-α, TRAIL) могут проводить как проапоптотический, так и антиапоптотический сигналы [4, 12]. Выбор пути, по которому движется клетка, определяется дозой, нагрузкой лиганда, взаимодействующего с рецептором, вовлечением других рецепторов.

Известно также, что зрелые Т-лимфоциты, циркулирующие в крови, относительно резистентны к проапоптотическим сигналам за счет стабильной экспрессии Bcl-2, однако чувствительность клеток к апоптозу увеличивается при активации митогенами и коррелирует с пролиферативной активностью [8]. Пролиферация при этом развивается быстрее и раньше достигает максимума (соответственно на 3-и и 5–6-е сутки), а продолжительность апоптотической реакции длительнее пролиферативной. Кульминацией иммунного ответа считается гибель большинства активированных Т-лимфоцитов, при действии дополнительных факторов эффективность индукции активационного апоптоза резко усиливается на пике пролиферативного ответа [1, 3].

Результаты настоящего исследования свидетельствуют, что исходом активации Т-лимфоцитов при действии на них Т-клеточного митогена и фукоидана из *F. evanescens* может быть как пролиферация, так и апоптоз. Увеличение количества апоптотических клеток при внесении фукоидана в культуру лимфоцитов, активированных ФГА, в конечной концентрации 100 мкг/мл, демонстрирует усиление чувствительности клеток к индукции апоптоза на высоте пролиферации.

Ранее мы показали, что фукоидан из *F. evanescens* обладает проапоптотической активностью в отношении лимфоцитов периферической крови в дозе 500 мкг/мл и не вызывает гибели этих клеток в 24-часовых культурах при конечной концентрации 100 мкг/мл. Реализация апоптоза лимфоидных элементов, индуцированная фукоиданом, была связана со снижением трансмембранного митохондриального потенциала и антиапоптотического протеина Bcl-xL [7]. Увеличение количества апоптотических клеток при внесении фукоидана в конечной концентрации 100 мкг/мл в культуру лимфоцитов, активированных ФГА, вероятно, обусловлено усилением чувствительности активированных клеток к индукции апоптоза на высоте пролиферации и может быть отражением суммации митогенных и проапоптотических сигналов фукоидана и ФГА. Вместе с тем, было подтверждено действие фукоидана из *F. evanescens* и как лиганда для Toll-подобных рецепторов, вызывающего активацию NF-κB при взаимодействии с этими

рецепторами. Показано также, что фукоидан из *F. evanescens* индуцирует продукцию активных форм кислорода нейтрофилами, синтез фактора некроза опухоли- α и интерлейкина-1 мононуклеарами, усиливает экспрессию рецепторов адгезии [2]. Апоптоз, индуцированный фактором некроза опухоли- α и Fas, в определенной степени обусловлен их способностью вызывать в клетке образование реактивных форм кислорода [13]. Кроме того, показано, что связывание рецептора адгезии L-селектина с углеводным лигандом фукоиданом индуцирует апоптоз в рецептор-экспрессирующих клетках [9]. Эти данные демонстрируют, что адгезивный сигнал, индуцированный фукоиданом, может быть преобразован в сигнал, ведущий к апоптотической смерти клетки. Учитывая полученные нами ранее данные, можно полагать, что оксидативный стресс, индукция цитокинов и адгезивный сигнал также вносят вклад в обеспечение проапоптотических свойств фукоидана.

Таким образом, полученные в настоящем исследовании результаты позволяют заключить, что исходом активации Т-лимфоцитов при действии на них митогена (ФГА) и фукоидана может служить как пролиферация, так и апоптоз. Ключевые события, определяющие выбор между этими формами, связаны с внутриклеточными механизмами (активацией NF- κ B, экспрессией Bcl-xL, снижением трансмембранного митохондриального потенциала) и зависят от интенсивности стимулирующего сигнала (дозы фукоидана), исходного состояния клетки (активация, покой) и ее внутренних потенциалов (пролиферативного потенциала).

Литература / References

1. Никонова М.Ф., Литвина М.М., Варфоломеева М.И. [и др.]. Апоптоз и пролиферация как альтернативные формы ответа Т-лимфоцитов на стимуляцию // Иммунология. 1999. Т. 20, № 2. С. 20–23.
Nikonova M.F., Litvina M.M., Varfolomeeva M.I. [et al.]. Apoptosis and proliferation as alternative forms of T-lymphocyte response to stimulation // Immunology. 1999. Vol. 20, No. 2. P. 20–23.
2. Фукоиданы – сульфатированные полисахариды бурых водорослей. Структура, ферментативная трансформация и биологические свойства / Анастюк С.Д., Беседнова Н.Н., Богданович Л.Н. [и др.]. Владивосток: Дальнаука, 2014. 377 с.
Fukoidany – sulfatirovannye polisaharidy buryh vodorosley. Struktura, fermentativnaya transformatsiya i biologicheskiye svoystva / Anastasyuk S.D., Besednova N.N., Bogdanovitch L.N. [et al.]. Vladivostok: Dalnauka, 2014. 377 p.
3. Ярилин А.А. Апоптоз: природа феномена и его роль в норме и при патологии // Актуальные проблемы патофизиологии: избранные лекции / под ред. Б.Б. Мороза. М.: Медицина, 2001. С. 13–56.
Yarilin A.A. Apoptoz: priroda fenomena i ego rol' v norme i pri patologii // Aktualnye problem patofiziologii / Ed. by B.B. Moroz. Moscow: Meditsina, 2001. P. 13–56.
4. Budd R. Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis // J. Clin. Invest. 2002. Vol. 109, No. 4. P. 437–442.
5. Chen D., Wu X., Wen Z. Sulfated polysaccharides and immune response: promoter or inhibitor? // Panminerva Med. 2008. Vol. 50, No. 2. P. 177–183.
6. Dupéré-Minier G., Desharnais P., Bernier J. Involvement of tyrosine phosphatase CD45 in apoptosis // Apoptosis. 2010. Vol. 15, No. 1. P. 1–13.
7. Gazha A.K., Zaporozhets T.S., Kuznetsova T.A. [et al.]. Effect of sulfated polysaccharides from brown algae on apoptosis of human peripheral blood lymphocytes // Bull. Exp. Biol. Med. 2015. Vol. 159, No. 5. P. 617–619.
8. Hildeman D.A., Zhu Y.N., Mitchell T.C. [et al.]. Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo // Curr. Opin. Immunol. 2002. Vol. 14. P. 354–359.
9. Ishiwatari-Hayasaka H., Kawashima H., Osawa T. [et al.]. Induction of cell death by chimeric L-selectin-Fas receptors // Int. Immunol. 1997. Vol. 9, No. 4. P. 627–635.
10. Krylov V.B., Ustyuzhanina N.E., Nifant'ev N. Synthesis of low molecular weight carbohydrate mimics heparin // Bioorg. Chem. 2011. Vol. 37. P. 745–779.
11. Nangia-Makker P., Conklin J., Hogan V. [et al.]. Carbohydrate-binding proteins in cancer, and their ligands as therapeutic agents // Mol. Medicine. 2002. Vol. 8. P. 187–192.
12. Sakata K., Sakata A., Vela-Roch N. [et al.]. Fas (CD95)-transduced signal preferentially stimulates lupus peripheral T lymphocytes // Eur. J. Immunol. 1998. Vol. 28. P. 2648–2660.
13. Sheng G.J., Oh Y.L., Chang S.K. [et al.]. Tunable heparan sulfate mimetics for modulating chemokine activity // J. Am. Chem. Soc. 2013. Vol. 135. P. 10898–10901.
14. Vishchuk O.S., Ermakova S.P., Zvyagintseva T.N. The fucoidans from brown algae of Far-Eastern seas: Anti-tumor activity and structure-function relationship // Food. Chem. 2013. Vol. 141. P. 1211–1217.
15. Wijesinghe W., Jeon Y. Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: A review // Carbohydrate Polymers. 2012. Vol. 88, No. 1. P. 13–20.

Поступила в редакцию 11.09.2018.

CELLULAR AND MOLECULAR MECHANISMS OF IMMUNOMODULATORY ACTION OF FUCOIDAN FROM BROWN ALGA *FUCUS EVANESCENS*

T.S. Zaporozhets¹, A.K. Gazha¹, T.N. Zvyagintseva², O.S. Malyarenko², N.N. Besednova¹

¹ Somov Institute of Epidemiology and Microbiology (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russian Federation), ² G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry (159/2 100 Anniversary of Vladivostok Ave. Vladivostok 690022 Russian Federation)

Objective. To determine the effect of fucoidan from *Fucus evanescens* on the dynamic processes of proliferation and apoptosis of human peripheral blood lymphocytes.

Methods. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were prepared by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation and cultured in 96-well flat-bottom culture plates in complete were medium RPMI 1640. PBMCs were either unstimulated or stimulated in vitro with the mitogen phytohemagglutinin (final concentration 1 and 10 μ g/ml), fucoidan (final concentration 1, 10, 100 μ g/ml). At the end of the incubation, the number of apoptotic cells was examined by a cytofluorimetric method of measuring hypodiploid DNA stained with propidium iodide. Cell proliferation was measured PBMCs by [³H] thymidine incorporation into DNA.

Results. Fucoidan from *F. evanescens* influenced the ability of PBMCs to blast transformation depending on the degree of proliferative cell potential: at the initially low level of spontaneous proliferation, the polysaccharide showed a stimulating effect, at the high level of spontaneous proliferation had an inhibitory effect. The direction of the effect of fucoidan also differed depending on the initial state of the cells (rest or activation) and the dose of the polysaccharide.

Conclusions. The outcome of the activation of T-lymphocytes by mitogen and fucoidan can be both proliferation and apoptosis. The increase in the number of apoptotic cells upon introduction of fucoidan into the culture of lymphocytes activated by phytohemagglutinin is due to the increased sensitivity of activated cells to the induction of apoptosis at the height of proliferation and may be a reflection of the summation of mitogenic signals of fucoidan and phytohemagglutinin.

Keywords: sulfated polysaccharides, lymphocyte activation, proliferation, apoptosis

УДК 616-002.71-06:616.98:579.842.23:612.017.1

DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2018.4.53-56

Влияние токсинов *Yersinia pseudotuberculosis* на реактивность клеток врожденного иммунитета

И.Н. Ляпун, Е.И. Дробот, Л.М. Сомова, Е.В. Псарёва, Н.Ф. Тимченко

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова (690087, г. Владивосток, ул. Сельская, 1)

Токсигенность бактерий псевдотуберкулеза обусловлена продукцией нескольких токсинов, к которым относятся термолabileльный летальный токсин и цитотоксический некротизирующий фактор. В работе охарактеризовано влияние этих токсинов на функциональную активность макрофагов перитонеального экссудата. Выявлено, что на макрофаги более выраженный стимулирующий эффект оказывал цитотоксический некротизирующий фактор, о чем свидетельствовали низкие значения эктоферментов плазмалеммы. При пролонгированном действии токсинов в макрофагах обнаруживалась активация кислородзависимой и нитроксидаобразующей систем. В то же время под воздействием цитотоксического некротизирующего фактора происходило угнетение продукции лизосомальных ферментов (неспецифической эстеразы), тогда как под воздействием термолabileльного токсина активность данного фермента выявлялась в начальные часы инкубации (до 6 часов).

Ключевые слова: псевдотуберкулез, термолabileльный летальный токсин, цитотоксический некротизирующий фактор, макрофаги

Псевдотуберкулез, или дальневосточная скарлатиноподобная лихорадка, вызываемый *Yersinia pseudotuberculosis*, широко распространен в Российской Федерации на территории Дальнего Востока и Сибири [1]. Заболевание сопровождается значительным снижением уровня иммунной защиты организма [3]. Основными свойствами *Y. pseudotuberculosis*, связанными с патогенностью, на начальном этапе инфекционного процесса служат адгезивность, инвазивность и токсигенность, которые реализуются уже в первые минуты после попадания возбудителя в организм [4, 12]. Токсигенность бактерий псевдотуберкулеза обусловлена продукцией нескольких токсинов: термостабильного летального токсина, термолabileльного летального токсина (ТЛТ), внешнего мембранного белка системы секреции III типа, суперантигена, а также факторов, нарушающих проницаемость сосудов кожи – раннего и позднего, цитотоксического некротизирующего фактора (cytotoxic necrotizing factor – CNF), которые кодируются генами хромосомы и плазмидой вирулентности [4, 12].

Известно, что для бактерий рода *Yersinia* макрофаг – клетка-мишень *in vivo*, при этом и *Yersinia pestis*, и *Y. pseudotuberculosis* могут выживать и размножаться в этой клетке [6]. Доказано, что иерсинии обладают способностью противостоять бактерицидным и фагоцитарным факторам системы врожденного иммунитета [6, 8]. Так, термостабильный токсин снижает фагоцитарную активность нейтрофилов и мононуклеарных лейкоцитов периферической крови человека. *Y. pseudotuberculosis*, несущая плазмиду вирулентности, ингибируют фагоцитарную активность макрофагов и вызывает апоптоз, как этих клеток, так и нейтрофилов [6, 15]. Также выделение бактериями CNF оказывает влияние на пролиферацию клеток, индуцирует фагоцитоз эпителиоцитов и снижает уровень CR3-опосредованного

макрофагального фагоцитоза, ингибирует выработку оксида азота нейтрофилами [9, 10, 14].

Цель настоящего исследования – анализ влияния ТЛТ и CNF *Y. pseudotuberculosis* на ферментативную активность резидентных макрофагов.

Материал и методы

Объектами исследования стали белки ТЛТ и CNF, выделенные из штамма *Y. pseudotuberculosis* 2517 III серовара (получен от Н. Mollaret, Франция), по методу, описанному Н.Ф. Тимченко и др. [4]. Оба токсина оказывали цитотоксическое действие на клетки Vero E6. Концентрации вносимых токсинов составили 10 мкг/мл, время наблюдения – от 1 до 48 часов.

Первичную культуру макрофагов получали из перитонеального экссудата морских свинок путем промывания полости брюшины 10 мл холодной (+4 °С) среды 199 («БиолоТ»), включавшей гепарин в концентрации 5 ед./мл. Суспензию клеток доводили до концентрации 2×10^6 /мл и разносили в плоскодонные 96-луночные микропланшеты – по 100 мкл на лунку. Для адгезии взвесь перитонеальных макрофагов оставляли в CO₂-инкубаторе при 37 °С, через 40 мин. клеточный монослой дважды отмывали от неадгезированных элементов и инкубировали в течение трех суток в среде 199 («БиолоТ»), содержавшей 5 % эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone) и 0,004 % гентамицина-К (KRKA), после чего отмывали два раза от антибиотика и использовали в экспериментах. Качество культуры оценивалось методом прижизненного наблюдения с помощью фазово-контрастной микроскопии.

Определение активности аденозинтрифосфатазы (АТФазы) и 5'-нуклеотидазы (аденозинмонофосфатазы – АМФазы) выполняли, добавляя к монослою клеток 20 мкл субстрата: 8 мг аденозинтрифосфата на 1 мл трис-НCl-буфера (рН 7,8), содержавшего 87 мг NaCl,

28,7 мг KCl, 52 мг MgCl₂ на 6H₂O, и 4 мг аденозинмонофосфата на 1 мл такого же буфера, содержавшего 87 мг NaCl и 70 мг MgCl₂. Выявление активности сукцинат- и лактатдегидрогеназы проводили по методу Z. Loida в собственной модификации [2].

Активность цитохромоксидазы определяли путем добавления к монослою клеток 100 мкл раствора 2 мг/мл 3,3-диаминобензидина на основе 0,1M ацетатного буфера (рН 5,5) с 1 г MnCl₂ и 300 мкл 33% перекиси водорода. Активность неспецифической эстеразы анализировали по методу Хейхоу и Квалинго [5] в собственной модификации. В качестве субстратов применяли α-нафтил-AS-ацетат и синий прочный ВВ. Содержание метаболитов оксида азота – нитритов (NO₂⁻) – определяли посредством Griess-реактива [13]. В качестве контроля использовали образцы с добавлением ингибитора реакции – NaF (ICN), 1,5 мг/мл.

Количество продуктов реакции вычисляли по поглощению раствора на спектрофотометре Labsystem Multiscan RC (Финляндия) при соответствующих для каждого из субстратов длинах волн и выражали в виде средних величин и их стандартных ошибок. Результаты спектрофотометрического анализа активности ферментов определяли на основе унифицированного

показателя – индекса стимуляции (Т), который вычисляли по формуле:

$$T = [(No - Nk) / Nk] \times 100 \%,$$

где Nk – средний показатель оптической плотности исследуемого субстрата в интактных макрофагах; No – средний показатель оптической плотности исследуемого субстрата в стимулированных токсинами макрофагах.

Результаты исследования

При внесении ТЛТ и CNF происходила незначительная активация макрофагов. Под влиянием ТЛТ отрицательные (по отношению к нулевому контролю) значения активности эктоферментов плазмалеммы (АТФазы и АМФазы) наблюдались через один час инкубации ($-3,7 \pm 0,004$ и $-0,68 \pm 0,04$ %) и вновь только через 48 часов $-3,7 \pm 0,004$ и $-2,7 \pm 0,03$ %, соответственно (рис. 1). Схожая динамика активности упомянутых ферментов фиксировалась при внесении CNF, при этом индекс стимуляции АТФазы и АМФазы через один час составил, соответственно, $-6,4 \pm 0,007$ и $-2,1 \pm 0,005$ %, а через 48 часов $-7,1 \pm 0,001$ и $-3,4 \pm 0,005$ % (рис. 2).

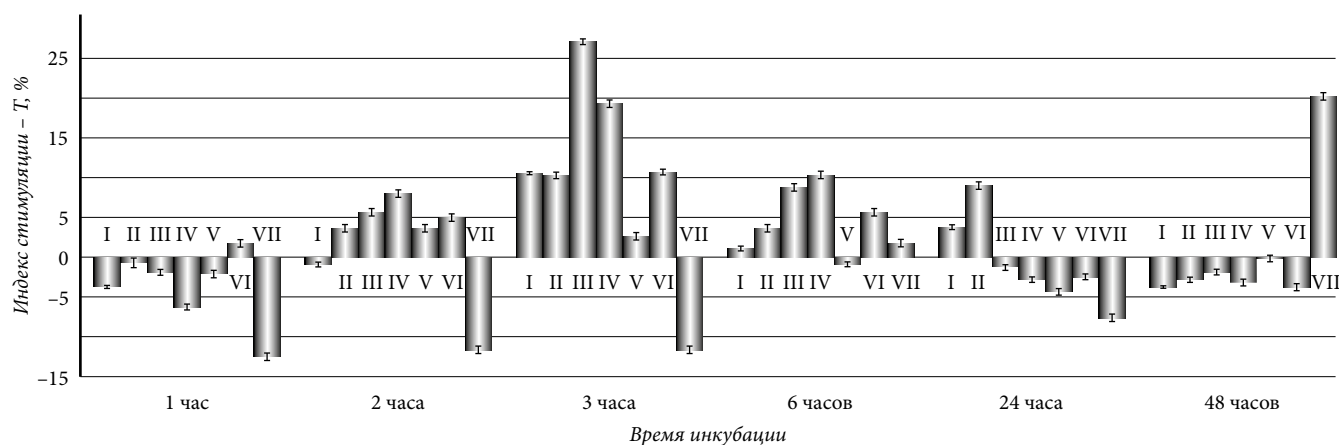


Рис. 1. Функциональная активность перитонеальных макрофагов при воздействии ТЛТ *Y. pseudotuberculosis*:

I – АТФаза, II – АМФаза, III – лактатдегидрогеназа, IV – сукцинатдегидрогеназа, V – цитохромоксидаза, VI – неспецифическая эстераза, VII – метаболиты оксида азота.

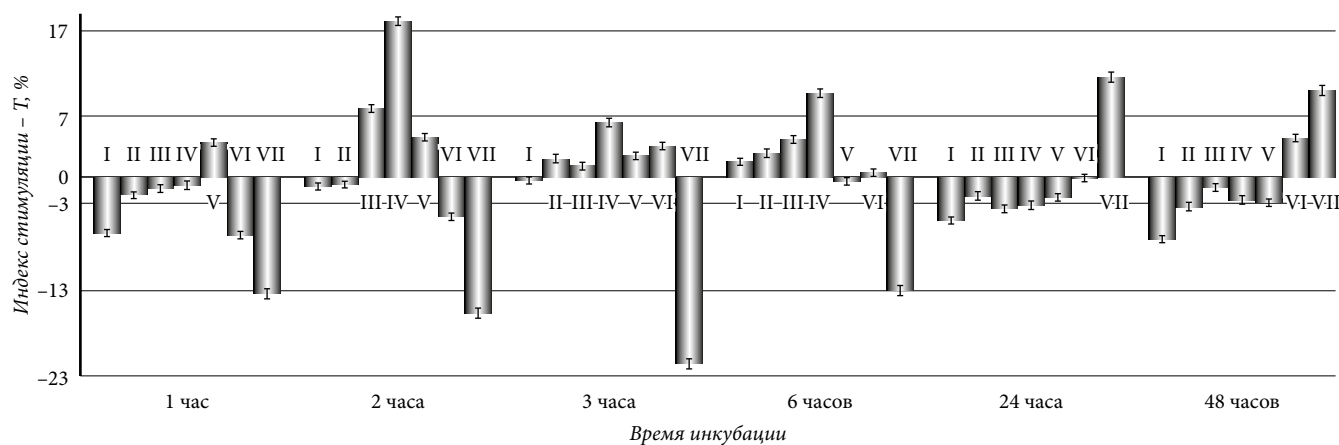


Рис. 2. Функциональная активность перитонеальных макрофагов при воздействии CNF *Y. pseudotuberculosis*:

I – АТФаза, II – АМФаза, III – лактатдегидрогеназа, IV – сукцинатдегидрогеназа, V – цитохромоксидаза, VI – неспецифическая эстераза, VII – метаболиты оксида азота.

При гистохимическом выявлении лактатдегидрогеназы может диффундировать в инкубационные среды, поэтому использованный нами метод спектрофотометрического анализа позволил более точно вычислить активность этого фермента в клетках. Было определено, что динамика выработки лактатдегидрогеназы в макрофагах после внесения ТЛТ совпадала с изменением активности сукцинатдегидрогеназы (рис. 1). Наибольшая активность указанных ферментов наблюдалась через три часа после внесения ТЛТ с последующим снижением до конца срока наблюдения. Так, через три часа инкубации значение индекса стимуляции сукцинатдегидрогеназы составило $19,2 \pm 0,003\%$, а лактатдегидрогеназы – $27 \pm 0,01\%$ по сравнению с контролем (который принят за ноль). При внесении же CNF максимальные индексы стимуляции сукцинат- и лактатдегидрогеназы ($18 \pm 0,01$ и $8 \pm 0,002\%$) выявлялись через два часа (рис. 2). Эти данные свидетельствуют в пользу того, что в ответ на воздействие этих токсинов *Y. pseudotuberculosis* в макрофагах увеличивалась продукция активных форм кислорода.

Активность цитохромоксидазы возрастала в начальные сроки инкубации после внесения токсинов (через два часа) с последующим снижением с переходом в отрицательные значения до конца срока наблюдения (48 часов) вне зависимости от вида токсина.

При изучении нитроксидзависимой системы макрофагов установлено, что количество внеклеточно экскретированных метаболитов оксида азота находилось в зоне отрицательных величин, возрастая лишь к концу срока наблюдения. Так, при внесении ТЛТ содержание внеклеточных нитритов достигло максимума только через 48 часов и составило $20,2 \pm 0,08\%$ (рис. 1), а при внесении CNF – через 24 часа и равнялось $11,6 \pm 0,001\%$ относительно контроля, который был принят за ноль (рис. 2).

По отношению к нулевому контролю в макрофагах при внесении ТЛТ показатель активности неспецифической эстеразы возрастал на ранних сроках инкубации (через три часа) до $10,5 \pm 0,001\%$ с последующим снижением к концу срока наблюдения до $-3,8 \pm 0,003\%$ (рис. 1). При внесении же CNF активность этого фермента находилась в зоне отрицательных значений, возрастая лишь спустя три и затем 48 часов контакта: $3,5 \pm 0,005$ и $4,6 \pm 0,004\%$, соответственно (рис. 2).

Обсуждение полученных данных

В ответ на вторжение инфекционных агентов, а также при взаимодействии бактерий с клетками врожденного иммунитета, включая резидентные макрофаги, в организме хозяина возникает комплекс морфофункциональных изменений [11]. Характерной особенностью метаболизма макрофагов можно назвать их способность к мгновенной активации под влиянием различных факторов экзогенного и эндогенного

происхождения. При этом преобразование этих фагоцитов из нестимулированного в стимулированное состояние связано с пространственными изменениями их цитоплазматической мембраны, о чем свидетельствует снижение активности ее эктоферментов: АМФазы и АТФазы [7]. В наших экспериментах установлено, что на макрофаги перитонеального экссудата более выраженный стимулирующий эффект оказывал CNF, на что указывали более низкие, чем для ТЛТ, концентрации экзоферментов.

В реакции преобразования активных форм кислорода принимают участие сукцинат- и лактатдегидрогеназы, которые активируются на последнем этапе гликолиза. Нами установлено, что на начальных сроках инкубации с токсинами (6 часов) в макрофагах происходила активация кислородзависимой системы, о чем свидетельствовали повышенные показатели уровней дегидрогеназ.

Y. Vi et al. [6] установили, что в макрофагах, зараженных *Y. pseudotuberculosis*, продукция нитритов (NO_2) выявлялась через 12–24 часа после инфицирования (срок наблюдения). Это согласуется с данными, полученными в ходе нашего эксперимента. Так, под влиянием токсинов *Y. pseudotuberculosis*, количество нитритов в резидентных макрофагах достигало максимальных значений к концу срока наблюдения (24–48 часов), что можно расценивать как проявление этими клетками эффекторных функций лишь на поздних сроках инкубации.

Неспецифическая эстераза относится к лизосомальным ферментам, обеспечивающим протеолитическую и переваривающую функции фагоцитов. Изменения эстеразной активности отражают физиологическую или иммунологическую стимуляцию макрофагов, показывая способность этих клеток к восприятию различных сигналов [5]. Этот фермент обнаруживается в эндоплазматической сети, лизосомах, а также его возможными местами локализации называют митохондрии и цитоплазму клеток.

Нами обнаружено, что при внесении ТЛТ в макрофагах активность данного фермента выявлялась в начальные часы инфицирования (1–6 часов), а в последующем переходила в отрицательные значения до конца срока наблюдения (48 часов). При внесении же CNF показатели активности неспецифической эстеразы находились на протяжении всего срока наблюдения в отрицательных значениях, возрастая только через 3 и 48 часов. Повышение внутриклеточного содержания неспецифической эстеразы указывало на наличие активного метаболизма углеводов в клетках, пораженных токсинами *Y. pseudotuberculosis*, тогда как отрицательные значения – на подавление защитной реакции макрофагов в ответ на внесение токсина.

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что в течение срока наблюдения по показателям эктоферментов плазмалеммы токсины

Y. pseudotuberculosis (ТЛТ и CNF) оказывали слабое активирующее действие на резидентные макрофаги. Достоверная стимуляция ферментов кислородзависимой системы (лактат- и сукцинатдегидрогеназы) обнаружена лишь в отдельные сроки наблюдения (через 3–6 часов инкубации для ТЛТ и через 2–6 часов для CNF), что совпадало со слабой стимуляцией активности цитохромоксидазы в этот период. Обращало на себя внимание угнетение нитроксидобразующей системы, особенно при действии CNF: достоверная наработка метаболитов оксида азота макрофагами выявлена только в поздние сроки инкубации: через 24 и 48 часов в ответ на введение CNF и через 48 часов – в ответ на введение ТЛТ. Достоверное повышение активности неспецифической эстеразы наблюдалось лишь через 3 часа инкубации при действии ТЛТ и незначительное – через 3 и 48 часов в ответ на влияние CNF.

Следовательно, можно сделать заключение о том, что известное в литературе иммунодепрессивное действие возбудителя псевдотуберкулеза (дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки) связано с угнетением активности кислородзависимой и нитроксидзависимой бактерицидных систем макрофагов, а также их переваривающей активности в ответ на воздействие факторов патогенности *Y. pseudotuberculosis* с токсической функцией (ТЛТ и CNF). Изменения функциональной активности макрофагов в ответ на действие ТЛТ и CNF носят сходный характер и имеют лишь количественные различия, что косвенно позволяет предположить аналогичность этих токсинов.

Литература / References

- Исачкова Л.М., Жаворонков А.А., Антоненко Ф.Ф. Патология псевдотуберкулеза. Владивосток: Дальнаука, 1994. 190 с.
Isachkova L.M., Zhavoronkov A.A., Antonenko F.F. Pathology of pseudotuberculosis. Vladivostok: Dalnauka, 1994. 190 p.
- Лойда З., Госсрау Р., Шиблер Т. Гистохимия ферментов: лабораторные методы. М.: Мир, 1982. 272 с.
Loida Z., Gossrau P., Shibler T. Enzyme histochemistry: Laboratory methods. Moscow: Mir, 1982. 272 pp.
- Псевдотуберкулез / Сомов Г.П., Покровский В.И., Беседнова Н.Н. [и др.]. М.: Медицина, 2001. 254 с.
Pseudotuberculosis / Somov G.P., Pokrovskiy V.I., Besednova N.N. [et. al.]. Moscow: Medicine. 2001. 254 p.
- Токсины *Yersinia pseudotuberculosis* / Тимченко Н.Ф., Недашковская Е.П., Долматова Л.С. [и др.]. Владивосток: Изд-во Приморского полиграфкомбината, 2004. 220 с.
Toxins *Yersinia pseudotuberculosis* / Timchenko N.F., Nedashkovskaya E.P., Dolmatova L.S. [et. al.]. Vladivostok: Publishing house of the Primorsk Polygraph Complex. 2004. 220 pp.
- Хейхоу Ф.Г., Кваглино Д.Д. Гематологическая цитохимия. М.: Медицина, 1983. 320 с.
Kheykhou F.G., Kvagliano D.D. Hematologic cytochemistry. Moscow: Meditsina. 1983. 320 p.
- Bi Y., Wang X., Han Y. [et al.]. *Yersinia pestis* versus *Yersinia pseudotuberculosis*: Effects on host macrophages // Scand. J. Immunol. 2012. Vol. 76, No. 6. P. 541–551.
- Bras M., Queenan B., Susin S.A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying // Biochemistry (Moscow). 2005. Vol. 70, No. 2. P. 231–239.
- Hares M.C., Hinchliffe S.J., Strong P.C. [et al.]. The *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* toxin complex is active against cultured mammalian cells // Microbiology. 2008. Vol. 154, No. 11. P. 3503–3517.
- Heine W., Beckstette M., Heroven A.K. [et al.]. Loss of CNFY toxin-induced inflammation drives *Yersinia pseudotuberculosis* into persistency // PLoS Pathog. 2018. Vol. 14, No. 2. P. e1006858. doi: 10.1371/journal.ppat.1006858.
- Lonkar P., Dedon P.C. Reactive species and DNA damage in chronic inflammation: reconciling chemical mechanisms and biological fates // Int. J. Cancer. 2011. Vol. 128, No. 9. P. 1999–2009.
- Plekhnova N.G., Somova L.M., Slonova R.A. [et al.]. Metabolic activity of macrophages infected with hantavirus, an agent of hemorrhagic fever with renal syndrome // Biochemistry (Moscow). 2005. Vol. 70, No. 9. P. 990–997.
- Sadana P., Mönnich M., Unverzagt C., Scrima A. Structure of the *Y. pseudotuberculosis* adhesin Invasin E // Protein Sci. 2017. Vol. 26, No. 6. P. 1182–1195.
- Schulz K., Kerber S., Kelm M. Reevaluation of the Griess method for determining NO/NO₂– in aqueous and protein-containing samples // Nitric. Oxide. 1999. Vol. 3, No. 3. P. 225–234.
- Schweer J., Kulkarni D., Kochut A. [et al.]. The cytotoxic necrotizing factor of *Yersinia pseudotuberculosis* (CNFY) enhances inflammation and Yop delivery during infection by activation of Rho GTPases // PLoS Pathog. 2013. Vol. 9, No. 11. P. e1003746. doi:10.1371/journal.ppat.1003746.
- Spinner J.L., Seo K.S., O'Loughlin J.L. [et al.]. Neutrophils are resistant to *Yersinia YopJ*/P-induced apoptosis and are protected from ROS-mediated cell death by the type III secretion system // PLoS One. 2010. Vol. 5, No. 2. P. e9279. doi: 10.1371/journal.pone.0009279.

Поступила в редакцию 18.09.2018.

EFFECT OF YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS TOXINS ON THE REACTIVITY OF INNATE IMMUNITY CELLS

I.N. Lyapun, E.I. Drobot, L.M. Somova, E.K. Psareva, N.F. Timchenko

Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russian Federation)

Objective. The effect of thermolabile lethal toxin (TLT) and cytotoxic necrotizing factor (CNF) *Yersinia pseudotuberculosis* was studied on the enzymatic activity of peritoneal macrophages.

Methods. The subjects of the study were TLT and CNF proteins isolated from *Y. pseudotuberculosis* 2517, III serovar strain (obtained from H. Mollaret, France). The primary culture of macrophages was obtained from peritoneal exudate of guinea pigs. We studied enzymes: 5'-nucleotidase, ATPase, lactate dehydrogenase, succinate dehydrogenase, cytochrome oxidase, nonspecific esterase, NO metabolites – nitrite.

Results. Under the influence of TLT and CNF toxins, peritoneal macrophages were stimulated, as evidenced by low values of ectoenzymes. At the same time, under the influence of these toxins in phagocytes, stimulation of the oxygen-forming system enzymes was detected at the initial incubation times (1–6 h), and the stimulation of NO metabolites was at the end of the observation period. Against the background of increased activity of lysosomal enzymes (nonspecific esterase) in macrophages infected with TLT, the inhibition of lysosome functions was detected under the action of CNF toxin, which indicated suppression of the digestive capacity of phagocytes.

Conclusions. CNF toxin of *Y. pseudotuberculosis* exerts a more pronounced cytotoxic effect on macrophages than TLT, as evidenced by activity induced of oxygen and nitroxide-forming systems, and low values of lysosomal enzymes.

Keywords: *pseudotuberculosis*, thermolabile lethal toxin, cytotoxic necrotizing factor, macrophages

УДК 618.146–002–06:616–006.52:616–002.181:612.017.1

DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2018.4.57–59

Изменение уровня провоспалительных цитокинов у женщин с заболеваниями шейки матки, ассоциированными с папилломавирусной инфекцией

Т.А. Неужкина¹, М.С. Тулупова², Л.С. Матюшкина¹, А.А. Потапенко²¹ Тихоокеанский государственный медицинский университет (690002, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2),² Российский университет дружбы народов (117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6)

Оценивали содержание интерферона- γ (ИФН- γ) и интерлейкинов (ИЛ) 13 и 17 в сыворотке крови 38 пациенток с папилломавирусной инфекцией, в т.ч. 18 – с остроконечными аногенитальными кондиломами. Уровни ИФН- γ и ИЛ-17 повышались, однако достоверных различий между группами обследованных при разных клинических вариантах папилломавирусной инфекции выявлено не было. Уровень ИЛ-13 у женщин с аногенитальными кондиломами оказался вдвое выше, чем у больных без аногенитальных кондилом. Делается вывод, что высокое содержание ИЛ-13 в сыворотке крови при папилломавирусной инфекции может служить маркером стойкой воспалительной реакции, сопровождающей развитие кондилом.

Ключевые слова: папилломавирусная инфекция, остроконечные кондиломы, интерферон, интерлейкины

Папилломавирусная инфекция признана одной из самых распространенных инфекций, способных передаваться половым путем, и выявлена у 30,3 % населения европейской части России. По данным ВОЗ, ежегодно в мире регистрируется более 500 000 тысяч новых случаев заражения вирусом папилломы человека (ВПЧ). Интерес к изучению данной патологии продолжает расти, так как она представляет собой социально значимую проблему из-за онкогенного воздействия вируса. Так, у 95 % женщин репродуктивного возраста с фоновыми, предраковыми заболеваниями и раком шейки матки в биоптатах выявляется ВПЧ [2, 4, 10]. Однако, у некоторых пациентов, благодаря активации клеточного и гуморального иммунитета, инфицирование ВПЧ не приводит к изменениям органов половой сферы и проходит в виде бессимптомного носительства или элиминируется самостоятельно. Таким образом, инфицирование с последующим развитием ВПЧ-ассоциированных заболеваний возникает у иммунокомпromетированных людей.

В настоящее время актуальность научных исследований в области иммунологии при вирусных поражениях направлена на изучение типа иммунного ответа. Одними из основных цитокинов, влияющих на распознавание, элиминацию и деградацию вируса, считаются интерферон- γ (ИФН- γ) и интерлейкины (ИЛ) 13 и 17. Соотношение данных цитокинов определяет тип иммунного ответа и, соответственно, клиническое течение вирусного заболевания.

ИФН- γ относится к семейству белков, запускающих межклеточные взаимодействия и обеспечивающих процессы иммунорегуляции. Нарушения выработки ИФН- γ может вести к прогрессированию патологического процесса. Однако единое мнение авторов о динамике уровня этого цитокина при вирусных заболеваниях отсутствует. Так, имеются данные о снижении

интенсивности его синтеза и секреции при ВПЧ-инфекции. В противовес этому, И.Н. Зуйкова и А.Е. Шульженко [5] показали, что до лечения патологии шейки матки, ассоциированной с ВПЧ, содержание ИФН- γ у всех пациенток исходно было высоким. Л.Д. Андосова и др. [1] выделили разные варианты иммунных нарушений у женщин с папилломавирусной инфекцией: у категории «инфицированные ВПЧ», зафиксировано повышение содержания ИФН- γ в цервикальном секрете и сыворотке крови, тогда как при интегративной форме инфекции у пациенток с тяжелыми интраэпителиальными поражениями шейки матки было зарегистрировано снижение уровней этого цитокина.

ИЛ-17 – Т-лимфоцитарный цитокин, действующий на различные типы клеток. Его участие в иммунном ответе обеспечивает защиту от патогенных микроорганизмов. Однако повышение экспрессии этого цитокина может приводить к воспалительным реакциям, в которые вовлекаются и другие цитокины и хемокины [7]. Т. Kuwabara et al. [14] продемонстрировали индукцию ИЛ-17 выработки хемокинов, определяющих движение и миграцию гранулоцитов и усиливающих экспрессию молекул клеточной адгезии на поверхности мембран фибробластов и кератиноцитов.

ИЛ-13 – регуляторный полипептид, который синтезируется Т-хелперами и цитотоксическими лимфоцитами, его могут синтезировать активированные В-лимфоциты, эозинофилы, базофилы и тучные клетки. Данный цитокин оказывает стимулирующее влияние на биосинтез сосудистых молекул клеточной адгезии. Одной из его основных функций считается стимуляция дифференцировки активированных антигеном наивных Т-хелперов в направлении Т-хелперов 2-го типа и подавление синтеза ИФН- γ . Будучи фактором дифференцировки лимфоцитов, ИЛ-13 поддерживает становление гуморального иммунного ответа, но его гиперпродукция способствует развитию неэффективной реакции при вирусных инфекциях [12, 15].

Противоречивость данных литературы предопределяет необходимость дополнительных исследований цитокинового профиля у женщин с цервикальной патологией, ассоциированной папилломавирусной инфекцией.

Материал и методы

Обследованы 38 пациенток с хроническим цервицитом, ассоциированным с ВПЧ (средний возраст 26,2 года). Женщин условно разделили на две группы:

1-я группа – 20 пациенток без остроконечных аногенитальных кондилом,

2-я группа – 18 пациенток с остроконечными аногенитальными кондиломами.

Контролем послужили результаты обследования 10 практически здоровых женщин-добровольцев (средний возраст – 29,5 года).

Определение уровней ИФН- γ , ИЛ-17 и ИЛ-13 в сыворотке венозной крови проводили с помощью специфических реактивов фирмы R&D Diagnostics Inc. (США) методом сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. Учет результатов выполняли с помощью иммуноферментного анализатора Multiscan (Финляндия). Расчет концентрации цитокинов осуществляли путем построения калибровочной кривой с помощью компьютерной программы.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы SPSS v. 16. Уровни цитокинов выражали в виде средних величин и их стандартных отклонений. Внутри- и межгрупповые различия оценивали с помощью критерия Манна–Уитни. Для проверки наличия взаимосвязи между величинами применяли критерий χ^2 . Уровень достоверной вероятности был задан равным 95 %.

Результаты исследования

У представительниц 1-й и 2-й групп наблюдения было установлено достоверное повышение уровней всех исследованных цитокинов в сыворотке крови. Однако достоверных различий в содержании ИФН- γ и ИЛ-17 между группами обследованных при разных клинических вариантах папилломавирусной инфекции выявлено не было. Уровень ИЛ-13 был достоверно выше контроля в сыворотке венозной крови всех пациенток, и в то же время во второй группе его содержание было вдвое выше, чем в первой (табл.).

Обсуждение полученных данных

Повышение уровня ИФН-гамма в основных группах наблюдения по сравнению с группой контроля было двукратным. Это позволяет говорить об активации натуральных киллеров, Т-хелперов 1-го типа и макрофагов при папилломавирусной инфекции независимо от клинических особенностей заболевания. Полученные данные согласуются с результатами исследования Л.В. Пузыревой и А.Д. Сафонова [11], где

Таблица

Содержание цитокинов в сыворотке крови 38 женщин с папилломавирусной инфекцией

Цитокин	Уровень в сыворотке крови, пг/мл		
	Контроль	1-я группа	2-я группа
ИФН-гамма	10,1±0,9	18,9±8,1 ^а	20,1±9,1 ^а
ИЛ-17	1,2±0,5	8,2±1,4 ^а	7,3±0,4 ^а
ИЛ-13	8,6±1,3	28,2±7,6 ^а	73,1±11,0 ^{а, б}

^а Разница с группой контроля статистически значима.

^б Разница с 1-й группой статистически значима.

на примере оппортунистических инфекций было продемонстрировано повышение уровня ИФН- γ , что приводило к активации клеточных реакций иммунитета.

Повышенное содержание в сыворотке крови ИЛ-17 считается одним из основных факторов защиты организма от бактериальных и вирусных инфекций [11]. Этот цитокин способствует миграции нейтрофилов в воспалительную зону и стимуляции каскада цитокинов, направленного на элиминацию патогена. В исследовании И.А. Булатовой [3] на примере хронического гепатита С было показано, что возрастание уровня ИЛ-17 регистрировалось лишь у 14 % больных. ИЛ-17 также осуществляет взаимосвязь между врожденным и приобретенным иммунитетом [13]. Считают, что его высокое содержание в сыворотке крови женщин с остроконечными аногенитальными кондиломами можно отнести к факторам высокого онкогенного риска [6].

Результаты настоящего исследования противостоят данным, полученным И.Н. Кизей [7], которая в своей диссертационной работе показала, что стимуляция экспрессии интерферона-гамма на фоне активации клеточного иммунитета развивается напрямую с необходимой для реализации эффективного противовирусного ответа супрессией синтеза ИЛ-13.

ИЛ-13 имеет схожие биологические эффекты с интерлейкином-4, однако при воспалительных процессах уровень последнего, как правило, снижается, а уровень интерлейкина-13 – нет [12]. Последний принимает участие в иммунных реакциях, будучи модулятором активности моноцитов и В-клеток, но в отличие от интерлейкина-4 напрямую не влияет на Т-лимфоциты [13]. На нашем материале определено, что увеличение уровня интерлейкина-13 в сыворотке крови более 38 пг/мл сопряжено с сочетанными клиническими проявлениями папилломавирусной инфекции – хроническим цервицитом и остроконечными кондиломами ($\chi^2 = 27,686$, $df = 1$, $p < 0,001$).

Таким образом, повышение концентраций исследованных цитокинов в сыворотке венозной крови свидетельствовало об активации иммунной системы. Организм на данной стадии патологического процесса пытается элиминировать патогены путем усиления продукции и секреции биологически активных веществ, что играет важную роль в процессах саногенеза организма. Высокое содержание интерлейкина-13 в сыворотке крови при папилломавирусной инфекции

может служить маркером стойкой воспалительной реакции, сопровождающей развитие кондилом, и таким образом косвенно указывать на тип папилломавирусной инфекции. Подобное заключение требует дополнительных исследований.

Литература / References

- Андосова Л.Д., Конторщикова К.Н., Шахова К.А. Роль факторов местного иммунитета в манифестации ВПЧ-ассоциированных поражений шейки матки // Медицинский альманах. 2016. № 5. С. 95–97.
- Andosova L.D., Kontorshchikova K.N., Shakhova K.A. Role of local immune system factors in manifestation of HPV-associated lesions of uterine neck // Medical Almanac. 2016. No. 5. P. 95–97.
- Брико Н.И., Лопухов А.Д. Необходимость контроля ВПЧ-ассоциированных заболеваний // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2017. Т. 16, № 2. С. 10–15.
- Briko N.I., Lopukhov A.D. The need to control HPV-related diseases // Epidemiology and Vaccine Prevention. 2017. Vol. 16, No. 2. P. 10–15.
- Булагова И.А. Исследование интерлейкина-17 и полиморфизма гена интерлейкина-17F (RS763780) при хроническом гепатите С // Пермский мед. журнал. 2014. Т. 31, № 1. С. 103–108.
- Bulatova I.A. Investigation of interleukin-17 and interleukin-17F gene (RS763780) polymorphism in chronic hepatitis C // Perm Medical Journal. 2014. Vol. 31, No. 1. P. 103–108.
- Джалалова П.М., Томилова И.К., Алексахина Е.Л., Лапочкина Л.П. Роль локального оксидативного стресса в патогенезе интраэпителиальной дисплазии и рака шейки матки // Исследования и практика в медицине. 2016. Т. 3 (спецвыпуск). С. 68–69.
- Dzhalalova P.M., Tomilova P.M., Aleksahina E.L., Lapochkina N.P. The role of local oxidative stress in the pathogenesis of intraepithelial dysplasia and cervical cancer. // Research n Practical Medicine Journal. 2016. Vol. 3 (Supl.). P. 68–69.
- Зуйкова И.Н., Шульженко А.Е. Персистирующая папилломавирусная инфекция: цитокиновый дисбаланс и подходы к терапии // Эффективная фармакотерапия. 2013. № 2. С. 54–60.
- Zuykova I.N., Shulzhenko A.E. Persistent human papillomavirus infection: cytokine dysbalance and treatment strategies // Effective Pharmacotherapy. 2013. No. 2. P. 54–60.
- Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. СПб.: Фолиант, 2008. 552 с.
- Ketlinsky S.A., Simbircev A.S. Cytokines. St. Petersburg: Foliant, 2008. 552 p.
- Кизей И.Н. Состояние цитокинового статуса при папилломавирусной инфекции кожи и патогенетическое обоснование методов лечения: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Владивосток, 2010. 22 с.
- Kizey I.N. The state of cytokine status in papillomavirus infection of skin and pathogenetic reason of treatment methods: Thesis of PhD. Vladivostok, 2010. 22 p.
- Маркеева Д.А. Особенности гуморального звена иммунитета у женщин и мужчин, инфицированных ВПЧ высокого онкогенного риска, в зависимости от вирусной нагрузки // Здоровье и образование в XXI веке. 2016. Т. 18, № 12. С. 23–26.
- Markeeva D.A. The features of humoral immunity for women and men who have HPV with high oncogenic risk depending on viral load // Health & Educational Millenium. 2016. Vol. 18, No. 12. P. 23–26.
- Просекова Е.В., Турянская А.И., Долгополов М.С. Семейство интерлейкина-17 при атопии и аллергических заболеваниях // Тихоокеанский медицинский журнал. 2018. № 2. С. 15–20.
- Prosekova E.V., Turyanskaya A.I., Dolgoplov M.S. Interleukin-17 family in atopy and allergic diseases // Pacific Medical Journal. 2018. No. 2. P. 15–20.
- Протасов А.Д., Тезиков Ю.В., Костинов М.П. [и др.]. Сочетанное применение вакцинации и иммунопрепарата в достижении длительной клинической ремиссии хронической ВПЧ-инфекции, проявляющейся остроконечными кондиломами аногенитальной области // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016. № 3. С. 60–66.
- Protasov A.D., Tezikov Yu.V., Kostinov M.P. [et al.]. Combined use of vaccination and immunotherapy drugs to achieve a long-term clinical remission in patients with chronic HPV-infection manifested in condyloma accuminata of the anogenital area // Epidemiology and Vaccine Prevention. 2016. No. 3. P. 60–66.
- Пузырева Л.В., Сафонов А.Д. Генетический полиморфизм цитокинов: прошлое и будущее // Инфекции и иммунитет. 2016. Т. 6, № 2. С. 103–108.
- Puzrygova L.V., Safonov A.D. Genetic polymorphism of cytokines: past and future // Russian Journal of Infection and Immunity. 2016. Vol. 6, No. 2. P. 103–108.
- Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека. СПб.: Фолиант, 2018. 512 с.
- Simbircev A.S. Cytokines in the pathogenesis and treatment of diseases rights. St. Petersburg: Foliant, 2018. 512 p.
- Тепикина Е.Н. Значение интерлейкина-17 в диагностике и лечении различных вариантов ювенильного идиопатического артрита у детей и подростков: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Самара, 2011. 24 с.
- Tepikina E.N. The role of interleukin-17 in diagnosis and treatment of different variants of juvenile idiopathic arthritis of children and adolescents: Thesis of PhD. Samara, 2011. 24 p.
- Kuwabara T., Ishikawa F., Kondo M., Kakiuchi T. The role of IL-17 and related cytokines in inflammatory autoimmune diseases // Mediators of Inflammation. 2017. Vol. 2017. Article ID 3908061. 11 p.
- Moerman-Herzog A., Nakagawa M. Early defensive mechanisms against Human Papillomavirus infection // Clin. Vaccine Immunol. 2015. Vol. 22, No. 8. P. 850–857.

Поступила в редакцию 08.10.2018.

CHANGES IN THE LEVEL OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES IN WOMEN WITH DISEASES OF THE CERVIX UTERUS ASSOCIATED HUMAN PAPILLOMAVIRUS INFECTION

T.A. Nevezhkina¹, M.S. Tulupova², L.S. Matyushkina¹, A.A. Potapenko²

¹ Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladovostok 690002 Russian Federation), ² RUDN University (6 Mikluho-Maklaya St. Moscow 117198 Russian Federation)

Objective. The content of interferon- γ (IFN- γ) and interleukins (IL) 13 and 17 in the serum of women with human papillomavirus infection was examined.

Methods. 38 patients with chronic cervicitis associated with human papillomavirus infection (average age 26.2 years), including 18 – with pointed anogenital warts were observed. The control group – 10 healthy female volunteers. Cytokine levels were determined using specific reagents from R&D Diagnostics Inc. (USA) by the sandwich method of enzyme-linked immunosorbent assay.

Results. The levels of IFN- γ and IL-17 in the serum increased, however, no significant differences between the groups examined in various clinical variants of human papillomavirus infection were found. The level of IL-13 in women with anogenital warts was twice as high as in patients without anogenital warts.

Conclusions. The increase in the content of all cytokines presented in the study in the serum testified to the activation of the immune system. The high content of IL-13 in human papillomavirus infection can serve as a marker of a persistent inflammatory reaction that accompanies the development of warts.

Keywords: papillomavirus infection, pointed genital warts, interferon, interleukins

УДК 616.314.17-008.1:612.017.1

DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2018.4.60-62

Состояние мукозального иммунитета у пациентов с пародонтитом

А.А. Голицына, Ю.В. Югай, Ю.Ю. Первов, Т.Н. Климкина, В.К. Ковальчук

Тихоокеанский государственный медицинский университет (690002, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Выполнено исследование уровней цитокинов (фактора некроза опухоли- α , интерферона- γ , интерлейкинов 4 и 13) и секреторного иммуноглобулина А в слюне 65 пациентов, страдавших хроническим пародонтитом, в т.ч. 30 – в сочетании с сахарным диабетом II типа. Показано достоверное увеличение концентрации всех цитокинов и снижение концентрации иммуноглобулина. У пациентов с пародонтитом без сопутствующей патологии установлены гиперпродукция фактора некроза опухоли- α и дефицит секреторного иммуноглобулина А. При пародонтите, протекавшем на фоне сахарного диабета, обнаружено более выраженное повышение концентраций обоих интерлейкинов.

Ключевые слова: пародонтит, сахарный диабет, цитокины, иммуноглобулины

В обеспечении мукозального иммунитета полости рта важное значение играет слюна с большим количеством антимикробных компонентов (лизоцим, иммуноглобулины, лактоферрин и др.) и десневая жидкость, содержащая цитокины, иммуноглобулины, лейкоциты. С нарушением мукозального иммунитета связывают развитие хронического генерализованного пародонтита, который занимает одно из ведущих мест в структуре стоматологических заболеваний [2]. В свою очередь, пародонтит – одно из наиболее распространенных осложнений сахарного диабета. Воспаление пародонта, развивающееся на фоне нарушений углеводного обмена, характеризуется более тяжелым и неблагоприятным течением, что ухудшает состояние и качество жизни пациентов, приводя к потере зубов [3].

Материал и методы

В исследовании приняли участие 65 больных (41 женщина и 24 мужчины), в возрасте от 30 до 60 лет. Средний возраст женщин составил 48,5 года, мужчин – 53,5 года. Пациенты были условно разделены на две группы: 1-я группа – 30 пациентов (18 женщин и 12 мужчин), страдавшие сахарным диабетом II типа и пародонтитом различной степени тяжести; 2-я группа – 35 пациентов (23 женщины и 12 мужчин) с пародонтитом различной степени тяжести без сопутствующей патологии.

Контролем послужили данные обследования 30 практически здоровых добровольцев, сопоставимых по возрасту и полу.

В качестве материала исследования использовалась слюна пациентов. Уровни фактора некроза опухоли- α (tumor necrosis factor α – TNF α), интерферона- γ (interferonum γ – INF γ), интерлейкина (interleukin – IL) 4 и 13 определяли методом сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа с применением специфических реактивов R&D Diagnostics Inc (США), секреторного иммуноглобулина А (sIgA) – с помощью набора реактивов ИФА-БЕСТ (Россия). Учет резуль-

татов производили посредством иммуноферментного анализатора Multiscan (Финляндия). Расчеты количества цитокинов и sIgA проводили путем построения калибровочной кривой с помощью компьютерной программы. Статистическая обработка материала проведена с использованием программы SPSS v. 16 методами описательной статистики с вычислением средних и их стандартных ошибок ($M \pm m$). Достоверность разности между показателями групп оценивали с помощью t -критерия Стьюдента.

Результаты исследования

При анализе данных, полученных в результате исследования, установлено достоверное увеличение уровней TNF α в обеих группах наблюдения. Среди пациентов без сахарного диабета зарегистрировано более выраженное увеличение концентрации TNF α , чем в 1-й группе больных. Содержание INF γ в слюне также существенно увеличивалось, но достоверных различий между группами по этому показателю не установлено. Уровни IL-4 и IL-13 у пациентов обеих групп достоверно превышали контрольные показатели и были значимо выше на фоне сахарного диабета II типа. Концентрация sIgA была достоверно снижена у всех пациентов, причем в группе пациентов с пародонтитом без сопутствующей патологии установлено более выраженное снижение этого показателя (табл.).

Таблица

Уровни цитокинов и sIgA в слюне при пародонтите у пациентов с сахарным диабетом II типа и без сопутствующих заболеваний ($M \pm m$)

Субстрат	Контроль	1-я группа	2-я группа
TNF α , пг/мл	2,8 \pm 1,5	18,9 \pm 0,6 ^а	25,7 \pm 2,4 ^{а, б}
INF γ , пг/мл	12,4 \pm 1,5	223,9 \pm 0,3 ^а	225,4 \pm 0,5 ^а
IL-4, пг/мл	1,1 \pm 0,1	55,2 \pm 0,3 ^а	15,7 \pm 0,1 ^{а, б}
IL-13, пг/мл	3,9 \pm 0,3	153,3 \pm 5,0 ^а	125,8 \pm 2,6 ^{а, б}
sIgA, мг/л	207,5 \pm 11,3	159,6 \pm 4,8 ^а	119,7 \pm 4,6 ^{а, б}

^а Разница с контролем статистически значима.

^б Разница с 1-й группой статистически значима.

Голицына Анна Александровна – аспирант кафедры нормальной и патологической физиологии ТГМУ; e-mail: camerelle@yandex.ru

Обсуждение полученных данных

Провоспалительные цитокины вызывают подавление нормального процесса репарации фибробластами соединительной ткани. Важную роль в этом процессе играет фактор некроза опухоли, активирующий остеокластогенез [5]. В нашем исследовании было установлено достоверное увеличение уровней TNF α в обеих группах больных в сравнении с контролем, особо выраженное во 2-й группе. Так, в слюне пациентов с сопутствующей патологией зарегистрировано увеличение уровня TNF α в 6 раз, а у пациентов с пародонтитом без нарушений углеводного обмена – в 9 раз (табл.). Полученные данные согласуются с результатами других исследований, которые также указывают на локальное повышение концентрации этого цитокина при пародонтите [10]. Считается, что высокий локальный уровень TNF α свидетельствует о скоплении тучных клеток и макрофагов в очаге воспаления, которые служат основными продуцентами цитокинов, оказывающих деструктивное воздействие на ткани пародонта путем активации процессов перекисного окисления липидов и высвобождения агрессивных биологических веществ [7].

Роль INF γ у больных, страдающих пародонтитом, изучена недостаточно. При анализе наших показателей выявлено существенное увеличение его содержания у пациентов обеих групп. Однако между группами наблюдения не было установлено различий в концентрации этого цитокина. При анализе публикаций найден ряд разноречивых данных в отношении INF γ . Так T.G. Wilson et al. [15] писали, что экспрессия INF γ была значительно выше у лиц с пародонтитом, нежели у здоровых людей, тогда как Д.В. Шмидт и др. [10] получили прямо противоположные результаты.

IL-4 уменьшает деструктивно-воспалительный процесс в пародонтальных тканях, сдерживает остеопороз, стимулирует образование антител, а также подавляет синтез TNF α [11]. В ходе исследования было установлено увеличение содержания IL-4 у пациентов обеих групп. При этом у лиц с пародонтитом, развившимся на фоне сахарного диабета II типа, выявлено достоверное повышение этого показателя в 3,5 раза. Полученные данные согласуются с аналогичными исследованиями С.П. Яровой и др. [11], которые также обнаружили возрастание концентрации этого интерлейкина у больных сахарным диабетом и пародонтитом, но противоречат результатам исследований J.R. Gonzales et al. [12], установивших снижение содержания IL-4 в смешанной слюне и десневой жидкости при пародонтите.

IL-13, который вырабатывается Т-хелперами 2-го типа, обладает иммуносупрессивной и противовоспалительной активностью и служит модулятором функций моноцитов, макрофагов и В-лимфоцитов. Предполагают, что он играет важную роль в регуляции резорбции альвеолярной костной ткани [14]. Однако его значение в воспалительных заболеваниях

пародонта остается малоизученным. Анализ уровней IL-13 на нашем материале позволил установить его гиперпродукцию у пациентов обеих групп. При этом в слюне больных пародонтитом и сахарным диабетом определено увеличение его концентрации в 39 раз, а в группе лиц без нарушений углеводного обмена – в 32 раза. J.R. Gonzales et al. [13] также отмечали повышение уровня IL-13 в ротовой жидкости пациентов с пародонтитом. Предполагаем, что этот факт можно связать с его компенсаторной продукцией иммуоцитами слизистой оболочки полости рта.

Адаптивный иммунитет играет важную роль в защите организма. В частности, иммуноглобулины служат главным элементом специфической гуморальной антимикробной защиты. Основная роль в полости рта здесь отведена иммуноглобулину А. Существуют две его разновидности: сывороточный и секреторный [8]. Секреторный иммуноглобулин устойчив к протеолизу, что имеет важное биологическое значение, поскольку одним из механизмов антибактериальной защиты полости рта считается нарушение (под действием sIgA) адгезии бактерий [1]. На нашем материале установлено достоверное снижение уровня sIgA у пациентов обеих групп. Причем среди больных пародонтитом без сопутствующей патологии зарегистрировано более выраженное снижение этого показателя. При анализе данных, полученных другими авторами, в этом вопросе обнаруживаются противоречивые результаты. Например, Н.Н. Цыбиков др. [9] и Л.П. Малежик и др. [6] независимо друг от друга установили увеличение концентрации sIgA в слюне при хроническом пародонтите. В то же время М.В. Козодаева и др. [4], напротив, указывали на снижение соотношения «sIgA:IgA» при высоком содержании иммуноглобулина А в смешанной слюне, что свидетельствовало об уменьшении продукции секреторного компонента эпителиальными клетками слизистой оболочки полости рта. Можно предположить, что снижение концентрации sIgA может быть обусловлено причинами как местного, так и системного характера, с нарушением способности к его синтезу и формированием индуцированной недостаточности гуморального типа.

Таким образом, у пациентов, страдавших хроническим пародонтитом, в слюне зарегистрировано достоверное увеличение уровней TNF α , INF γ , IL-4 и IL-13 и снижение концентрации sIgA. В группе лиц с пародонтитом, протекавшим на фоне сахарного диабета II типа, установлено более значимое повышение уровней интерлейкинов. У больных пародонтитом без сопутствующей патологии обнаружена гиперпродукция TNF α и дефицит sIgA.

Полученные результаты свидетельствуют о клинически значимой несостоятельности как врожденного, так и адаптивного гуморального иммунитета, характеризующейся нарушением цитокинового баланса и гипопродукцией секреторного иммуноглобулина А, что обуславливает ослабление местной иммунной защиты полости рта.

Литература / References

1. Биктимерова О.О., Рединова Т.Л., Зорин А.Ю. Изменение клинических и иммунологических показателей полости рта у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом при лечении пробиотиками // Тихоокеанский медицинский журнал. 2014. № 3. С. 34–36.
Biktimerova O.O., Redinova T.L., Zorin A.Yu. Changes in clinical and immunological parameters of the oral cavity in patients with chronic generalized periodontitis in the treatment of probiotics // Pacific Medical Journal. 2014. No. 3. P. 34–36.
2. Журбенко В.А., Юдина С.М. Влияние озонотерапии на состояние мукозального иммунитета полости рта при хроническом пародонтите // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». 2013. № 4. С. 73–77.
Zhurbenko V.A., Yudina S.M. The effect of ozonotherapy on the state of mucosal immunity of the oral cavity in chronic periodontitis // Kursk Scientific and Practical Herald "The Man and His Health". 2013. No. 4. P. 73–77.
3. Зырянов Б.Н. Стоматологические маркеры поражения полости рта при сахарном диабете 2 типа у лиц среднего возраста // Молодой ученый. 2014. № 3. С. 178–181.
Zyryanov B.N. Dental markers of the oral cavity in type 2 diabetes mellitus in middle-aged people // Young Scientist. 2014. No. 3. P. 178–181.
4. Козодаева М.В., Иванова Е.В., Манулов Б.М. Состояние пародонта у больных сахарным диабетом (обзор) // Пародонтология. 2012. № 1. С. 3–7.
Kozodaeva M.V., Ivanova E.V., Manulov B.M. Condition of periodontal disease in patients with diabetes mellitus (review) // Parodontology. 2012. No. 1. P. 3–7.
5. Кулаков А.А., Зорина О.А., Борискина Ш.А. Роль защитных факторов организма в патогенезе воспалительных заболеваний пародонта // Стоматология. 2010. № 6. С. 72–77.
Kulakov A.A., Zorina O.A., Boriskina Sh.A. The role of protective factors in the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases // Stomatology. 2010. No. 6. P. 72–77.
6. Малежик Л.П., Пинелис Ю.И., Малежик М.С. Некоторые аспекты иммунных реакций при хроническом генерализованном пародонтите у пожилых людей // Стоматология. 2011. № 6. С. 8–10.
Malyzhik L.P., Pinelis Yu.I., Malezhik M.S. Some aspects of immune reactions in chronic generalized periodontitis in elderly people // Dentistry. 2011. No. 6. P. 8–10.
7. Патрушева М.С., Михальченко В.Ф., Яковлева А.Т. Оценка цитокинового профиля и активности ферментов десневой жидкости у жителей г. Волгограда с интактным пародонтом и при пародонтите легкой степени тяжести // Живые и биосистемы. 2013. № 4. URL: <http://www.jbks.ru/archive/issue-4/article-7> (дата обращения: 03.08.2018 г.).
Patrusheva M.S., Mikhachenko V.F., Yakovleva A.T. Evaluation of the cytokine profile and activity of gingival fluid enzymes in Volgograd residents with intact parodontium and with mild periodontitis // Living and biosidic systems. 2013. No. 4. URL: <http://www.jbks.ru/archive/issue-4/article-7> (date of access: 03.08.2018).
8. Успенская О.А., Шевченко Е.А., Болтенко С.А. Современные методы лечения хронического рецидивирующего афтозного стоматита у женщин с урогенитальной инфекцией и без нее // Современные проблемы науки и образования. 2015. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=17642> (дата обращения: 03.08.2018 г.).
Uspenskaya O.A., Shevchenko E.A., Boltenko S.A. Modern methods of treatment of chronic recurrent aphthous stomatitis in women with urogenital infection and without it // Modern problems of science and education. 2015. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=17642> (date of access: 03.08.2018).
9. Цыбиков Н.Н., Пинелис Ю.И., Малежик М.С., Малежик Л.П. Выявление иммуноглобулинов, антител против белков теплового шока и цитокина IL-8 в слюне больных хроническими заболеваниями пародонта // Медицинская иммунология. 2010. Т. 12, № 4–5. С. 421–424.
Tsybikov N.N., Pinelis Yu.I., Malezhik M.S., Malezhik L.P. Detection of immunoglobulins, antibodies against heat shock proteins and IL-8 cytokine in the saliva of patients with chronic periodontal diseases // Medical immunology. 2010. Vol. 12, No. 4–5. P. 421–424.
10. Шмидт Д.В., Шмагель К.В., Мозговая Л.А., Беляева О.В. Состояние местного иммунитета у больных с хроническим генерализованным пародонтитом // Стоматология. 2008. № 4. С. 33–38.
Shmidt D.V., Shmagel K.V., Mozgovaya L.A., Belyaeva O.V. State of local immunity in patients with chronic generalized periodontitis // Stomatology. 2008. No. 4. P. 33–38.
11. Ярова С.П., Саноян В.В., Белоус А.Ю., Скляренко Д.Е. Изучение иммунологических показателей сыворотки крови больных генерализованным пародонтитом на фоне сахарного диабета II типа // Вестник проблем биологии и медицины. 2009. № 4. С. 177–180.
Yarova S.P., Sanoyan V.V., Belous A.Yu., Sklyarenko D.E. The study of immunological parameters of blood serum of patients with generalized periodontitis against the background of type II diabetes mellitus // Bulletin of the problems of biology and medicine. 2009. No. 4. P. 177–180.
12. Gonzales J.R., Mann M., Stelzig J. [et al.]. Single-nucleotide polymorphisms in the IL-4 and IL-13 promoter region in aggressive periodontitis // J. Clin. Periodontol. 2007. Vol. 34. P. 473–479.
13. Gonzales J. R., Gröger S., Haley G. [et al.]. Production of interleukin-13 is influenced by the interleukin-4 –34TT and –590TT genotype in patients with aggressive periodontitis // Scandinavian Journal of Immunology. 2011. Vol. 73, No. 2. P. 128–134.
14. Mattes J., Yang M., Siqueira A. [et al.]. IL-13 induces airways hyperreactivity independently of IL-4Ra chain in the allergic lung // J. Immunol. 2001. Vol. 167. P. 1683–1692.
15. Wilson T.G., Kornman K. Fundamentals of periodontics. Tokyo: Quintessence Publishing Co., 2006. 564 p.

Поступила в редакцию 25.09.2018.

THE STATE OF MUCOSAL IMMUNITY IN PATIENTS WITH PERIODONTITIS

A.A. Golitsyna, Yu.V. Yugay, Yu.Yu. Pervov, T.N. Klimkina, V.K. Kovalchuk
Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 690002 Russian Federation)

Objective. With the violation of mucosal immunity, the development of chronic generalized periodontitis is associated, which occupies one of the leading places in the structure of dental diseases. Of great interest are the immunological aspects of the formation of periodontal pathology in conditions of violations of carbohydrate metabolism.

Methods. 65 patients were examined, including: 30 patients – 1st group and 35 patients – 2nd group. The control group consisted of healthy volunteers (30 people). Levels of TNF α , INF γ , IL-4, IL-13 and sIgA were determined by the sandwich version of the enzyme-linked immunosorbent assay. The statistical processing of the material was carried out using the SPSS v 16 program.

Results. Significant increases in TNF α , INF γ , IL-4 and IL-13 levels were registered in both groups of patients, as well as a decrease in sIgA concentrations. In patients with periodontitis without concomitant pathology, hyperproduction of TNF α and a deficiency of sIgA have been established. In the group of patients suffering from periodontitis against the background of type II diabetes, a more significant increase in IL-4 and IL-13 was revealed.

Conclusions. the obtained results of the study testify to the clinically significant insolvency of both congenital and adaptive humoral immunity, characterized by a violation of the cytokine balance and hypo production of sIgA, which causes weakening of the local immune defense of the oral cavity.

Keywords: periodontitis, diabetes, cytokines, immunoglobulins

Pacific Medical Journal, 2018, No. 4, p. 60–62.

УДК 616.36–002.2–06:616.36–002.17–074

DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2018.4.63–70

Оксидативное и нитрозативное повреждение ДНК в патогенезе фиброза печени при хронических вирусных гепатитах

А.О. Михайлов¹, А.Ф. Попов², В.А. Иванис², Е.В. Хамуева¹, Н.С. Иванова², А.И. Симакова²¹ Краевая клиническая больница № 2 (690105, г. Владивосток, ул. Русская, 55),² Тихоокеанский государственный медицинский университет (690002, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

В сыворотке крови 150 пациентов с хроническими вирусными гепатитами (ХВГ) В и С и в сыворотке крови и в гомогенатах печени, взятых после 31 аутопсии лиц, погибших от цирроза печени в исходе ХВГ, исследовали общую антиоксидантную активность, содержание 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина, 8-нитрогуанина, восстановленного глутатиона, малонового диальдегида и 4-гидрокси-2,3-ноненаля. Также методом комет анализировали степень деструкции ДНК в лимфоцитах периферической крови и гепатоцитах. Установлено, что деструкция ДНК гепатоцитов и лимфоцитов периферической крови – один из ведущих компонентов формирования фиброза печени при ХВГ В и С и может рассматриваться, как его патогномоничный маркер. Выявлена прямая связь поврежденный ДНК с выраженностью склеротических изменений в печени. Оксидативный и нитрозативный стресс вызывал в гепатоцитах и лимфоцитах значимые нарушения целостности мембранных органелл. Биохимические изменения в ткани печени при ХВГ В и С в целом сопоставимы с таковыми в сыворотке крови по всем показателям, что делает их перспективными в плане разработки алгоритмов диагностики фиброза печени.

Ключевые слова: метод ДНК-комет, оксидативный и нитрозативный стресс, гепатоциты, лимфоциты

Несмотря на большое количество исследований, посвященных вирусным гепатитам, многие вопросы их патогенеза до сих пор остаются нерешенными. В первую очередь это относится к патогенным свойствам самих вирусов, характеру и закономерностям реагирования организма-хозяина на антиген, формированию цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы и ряду других аспектов [4, 10]. С другой стороны, важна и оценка непосредственной генотоксичности вирусов гепатитов В и С [8]. В этом направлении разрабатываются теории, связанные с апоптозом гепатоцитов, считающимся ключевым моментом в патогенезе вирусного поражения печени. Однако работ, в которых оценивались бы количественные характеристики деструкции ДНК при вирусных гепатитах, не так уж много. Есть противоречивые данные о состоянии ДНК лимфоцитов периферической крови при хроническом вирусном гепатите (ХВГ). Одни авторы указывают здесь на наличие значимых изменений, другие эти данные не подтверждают [4, 7, 9]. К настоящему времени до конца не определена зависимость между степенью деструкции ДНК гепатоцитов и лимфоцитов в разных группах пациентов, страдающих вирусными гепатитами с циррозом печени и без него [5]. Существуют разногласия и в вопросах выделения ведущих факторов неблагоприятного прогноза заболевания. До сих пор неясным остается вклад повреждений ДНК в последующую регенерацию и пролиферацию гепатоцитов [10]. Еще более актуальными проблемами можно назвать выделение маркеров, способных предсказать переход цирроза печени в гепатоцеллюлярный рак, а также поиск путей предотвращения этой трансформации [8].

Михайлов Александр Олегович – врач-гастроэнтеролог ККБ № 2; e-mail: mao1991@mail.ru

Материал и методы

Настоящее исследование выполнено с 2012 по 2018 гг. и включало 150 пациентов 18–82 лет (в среднем – 40,1 года), страдавших ХВГ С и ХВГ В и находившихся на стационарном лечении в инфекционном отделении Краевой клинической больницы № 2 и отделении вирусных гепатитов Краевой клинической инфекционной больницы. Степень выраженности фиброза печени оценивалась по данным эластометрии. Все исследуемые по выраженности фиброза (категория F шкалы METAVIR) были условно разделены на шесть групп: ХВГ В (F0), ХВГ В (F1–2), ХВГ В (F3–4), ХВГ С (F0), ХВГ С (F1–2), ХВГ С (F3–4). Контрольную группу сформировали 43 добровольца без сопутствующих аутоиммунных, острых и хронических заболеваний.

Также были проанализированы истории болезни и материалы аутопсий 31 случая ХВГ С и В за 2012–2018 гг. Критериями включения в исследование здесь было наступление смерти от осложнений основного заболевания или от ургентных состояний. Возраст умерших колебался от 25 до 72 лет (средний возраст – 54,1 года). В контрольную группу для этого контингента наблюдений были взяты материалы судебно-медицинских аутопсий 16 человек без инфекционных заболеваний, сопоставимых по полу и возрасту, и погибших от черепно-мозговых травм. Субстратом для анализа служили образцы периферической крови, полученные от живых и умерших пациентов, а также ткань печени, взятая на аутопсии.

Оценку степени повреждения ДНК проводили методом ДНК-комет в щелочной среде [6, 15]. Для этого 50 мкл исследуемых образцов (отмытые лимфоциты, взвесь клеток печени) смешивали с 500 мкл 1 % раствора легкоплавкой агарозы (Sigma), приготовленной

на фосфатно-солевом буфере при температуре 37 °С, до финальной концентрации 104 клеток/мл. Затем 60 мкл клеточной суспензии наносили на срезы, предварительно покрытые нормоплавкой агарозой (Sigma), и накрывали покровными стеклами. Срезы для застывания агарозы хранили 5 мин. при температуре 4 °С. После затвердевания покровные стекла снимали, и препараты помещали в холодный (4 °С) лизирующий буфер (10 мМ Tris-HCl, pH 10, 2,5 мМ NaCl, 100 мМ EDTA-Na₂, 1 % Triton X-100, 10 % ДМСО) на час при 4 °С. По окончании лизиса препараты переносили в камеру для электрофореза, содержащую щелочной буфер (300 мМ NaOH, 1 мМ EDTA-Na₂) на 40 мин. Далее проводили электрофорез при напряжении 20 В и силе тока 300 мА в течение 25 мин. Срезы после электрофореза обрабатывали трижды по 5 мин. нейтральным буфером (0,4 М Tris-HCl, pH 7,5), затем дегидратировали метанолом и красили раствором бромида этидия (2 мкг/мл). Препараты ДНК просматривали на флуоресцентном микроскопе при увеличении в 200 крат. Полученные изображения анализировали с помощью программы CometScore. Просматривали не менее 100 клеток в каждом препарате.

Описанная модификация метода позволяла оценить количество одно- и двунитевых разрывов ДНК в ядродержащих клетках. При ее использовании представлялось возможным классифицировать и визуально подсчитать клетки, погибшие путем апоптоза и некроза. Для оценки степени повреждения ДНК применяли показатель содержания ДНК в хвосте комет. Также регистрировали количество комет с повреждениями ДНК более 50 %, известные в литературе под названием «апоптотические ДНК-кометы». Признаком некроза считали широкие рыхло-диффузные ДНК-кометы неправильной формы.

Определение уровней 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина и 8-нитрогуанина осуществляли на образцах сыворотки и гомогенатах с помощью наборов для иммуноферментного анализа: Highly Sensitive 8-OHdG Check ELISA (Fukuroi, Shizuoka, Japan) и Nitrosative DNA/RNA Damage ELISA Kit, 8-Nitroguanine Quantitation (Cell Biolabs, Inc.).

Для анализа общей антиоксидантной активности (ОАА) в предварительно нагретую и заполненную 0,1 М фосфатным буфером (pH 7, 37 °С) кварцевую кювету вносили 90 мкл раствора, содержащего 5 ммоль 2,2'-азинобис-3-этилбензотиазолин-6-сульфоната, и 10 мкл исследуемого образца (сыворотка, гомогенат). После этого в кювету быстро добавляли 300 мкл раствора, содержащего 200 ммоль 2,2'-азо-бис(2-амидинпропана) и, быстро встряхнув содержимое, ставили кювету в спектрофотометр (Shimadzu AA-6800) с термостатом (37 °С). Измеряли время, в течение которого оптическая плотность оставалась в пределах ± 10 (lag-time) в режиме абсорбции при длине волны 414 нм. Результаты пересчитывали на единицы ОАА, идентичные параметрам для тролокса (в ммоль/л).

Концентрацию восстановленного глутатиона измеряли в образцах (сыворотка, гомогенат) на спектрофотометре Shimadzu UV-1650PC по методу Sedlak and Lindsay, в котором реактив Элмана (5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота) реагирует с сульфгидрильными группами цистеина, образуя 2-нитро-5-меркаптобензойную кислоту с максимальной адсорбцией при 412 нм.

Индекс пероксидного окисления липидов оценивали по концентрации малонового диальдегида (МДА) и 4-гидрокси-2,3-ноненаля. Для этого 200 мкл образца (сыворотка, гомогенат) смешивали с 650 мкл раствора метанола-ацетонитрила (в соотношении 1:3), содержащего хромогенный агент N-метил-2-фенилиндол, и встряхивали. После добавления 150 мкмоль 15,4 М метансульфонової кислоты инкубировали 40 мин. при температуре 45 °С. Реакция между комплексом «малоновый диальдегид + 4-гидрокси-2,3-ноненаль» и N-метил-2-фенилиндролом давала стабильный хромофор, который подвергали спектрофотометрически в режиме абсорбции при длине волны 586 нм, используя 10 ммоль раствор 4-гидрокси-2,3-ноненаля в качестве стандарта. Концентрация 4-гидрокси-2,3-ноненаля равнялась разнице между общим комплексом продуктов перекисного окисления липидов и малоновым диальдегидом. Содержание белка в образцах определяли по методу Лоури.

Морфологическая оценка степени фиброза печени у умерших проводилась по стандартным методикам, принятым в патологической анатомии. Из заключенных в парафиновые блоки образцов готовили срезы толщиной 3–4 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином для обзорной микроскопии. Для оценки степени фиброза применялась окраска по ван Гизону. Для определения активности воспалительного процесса и выраженности фиброза печени использовалась полуколичественная шкала METAVIR.

По всем показателям крови, а также возрасту и полу пациентов были рассчитаны описательные статистические характеристики, в т.ч. средние арифметические (M) и их стандартные отклонения (s). Для тестирования статистической значимости различий между средними всех количественных показателей использовали тест Манна-Уитни для каждой пары групп, и полученные уровни значимости корректировали на множественность сравнений с помощью метода Холма. Также было проведено сравнение средних значений показателей крови и печени по следующим индикаторам: ОАА, 8-нитрогуанин, 8-гидрокси-2-дезоксигуанозин, восстановленный глутатион, 4-гидрокси-2,3-ноненаль и МДА. Для определения статистической значимости различий использовался тест знаков Вилкоксона с оценкой точных значений p-values. На ящичковых диаграммах Тьюки (рис. 1, 2, 4–8) отражены интерквартильная широта («ящик»), медиана (горизонтальная линия) и средние величины («звездочки»). Т-образные линии демонстрируют межквартильный размах, кружки – статистические выбросы.

Результаты исследования

ОАА в группе пациентов с ХВГ С (F3-4) существенно отличалась от контроля и группы ХВГ С (F1-2). В то же время этот показатель в группе ХВГ В (F3-4) также отличался от контроля. То есть можно допустить, что значения данного показателя связаны со стадией фиброза, но не связаны с типом гепатита. Можно предположить, что изменения здесь наступают еще на стадии F1-2 при ХВГ В, и на стадии F3-4 при ХВГ С (рис. 1).

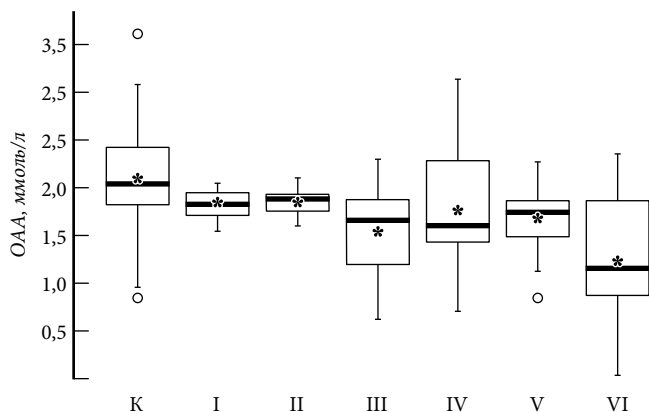


Рис. 1. ОАА сыворотки крови в зависимости от типа гепатита и степени фиброза:

К - контроль, I - ХВГ В (F0), II - ХВГ В (F1-2), III - ХВГ В (F3-4), IV - ХВГ С (F0), V - ХВГ С (F1-2), VI - ХВГ С (F3-4).

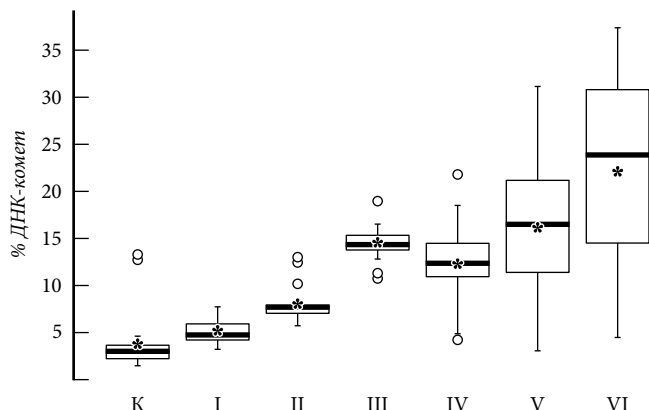


Рис. 2. Доля ДНК в хвосте комет лимфоцитов в зависимости от типа гепатита и степени фиброза:

К - контроль, I - ХВГ В (F0), II - ХВГ В (F1-2), III - ХВГ В (F3-4), IV - ХВГ С (F0), V - ХВГ С (F1-2), VI - ХВГ С (F3-4).

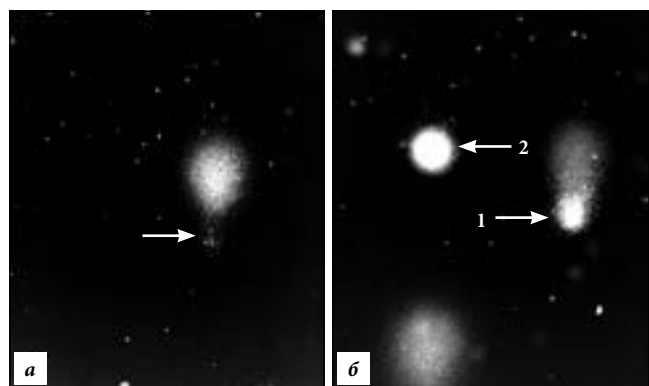


Рис. 3. Микрофотографии ДНК-комет:

а - ДНК-комета, соответствующая апоптотической клетке (стрелка) у пациента с ХВГ С (F3); б - ДНК-комета у пациента с ХВГ В (стрелка 1 - комета с 44,43% ДНК в хвосте, стрелка 2 - комета с 2,78% ДНК). Окр. этидиума бромидом, $\times 200$.

броза, но не связаны с типом гепатита. Можно предположить, что изменения здесь наступают еще на стадии F1-2 при ХВГ В, и на стадии F3-4 при ХВГ С (рис. 1).

Также обнаружено, что по следующим показателям есть значимые различия между группами пациентов с одинаковой стадией фиброза, но разными типами гепатита: доля ДНК в хвосте комет лимфоцитов для всех стадий фиброза (рис. 2, 3), содержание в сыворотке крови 8-нитрогуанина (рис. 4), 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина (рис. 5), восстановленного глутатиона (рис. 6), МДА - только для степени F3-4 (рис. 7) и 4-гидрокси-2,3-ноненаля - только для степени F1-2 (рис. 8). То есть значения этих показателей были связаны не только с наличием гепатита и стадией фиброза, но и с типом гепатита. Из них по 8-гидрокси-2-дезоксигуанозину и восстановленному глутатиону изменения в группе пациентов с ХВГ С наступали, начиная с F0, а в группе пациентов с ХВГ В - с F1-2. По остальным показателям из данной категории изменения при гепатитах регистрировались уже со стадии F0.

Характеризуя течение ХВГ В, следует заметить, что внутри групп пациентов с различными стадиями фиброза соотносятся следующие показатели (по остальным связи со стадией не обнаружено): доля

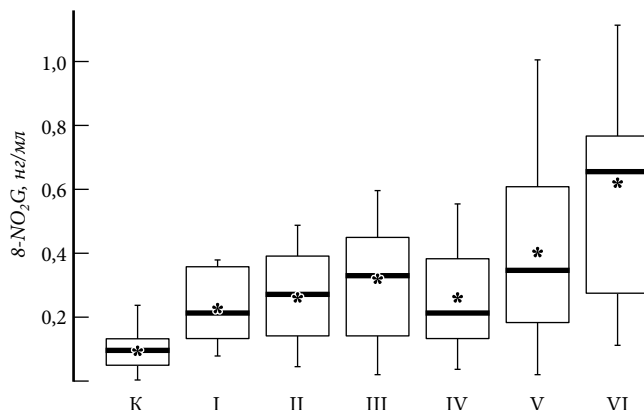


Рис. 4. Содержание 8-нитрогуанина в сыворотке крови в зависимости от типа гепатита и степени фиброза:

К - контроль, I - ХВГ В (F0), II - ХВГ В (F1-2), III - ХВГ В (F3-4), IV - ХВГ С (F0), V - ХВГ С (F1-2), VI - ХВГ С (F3-4).

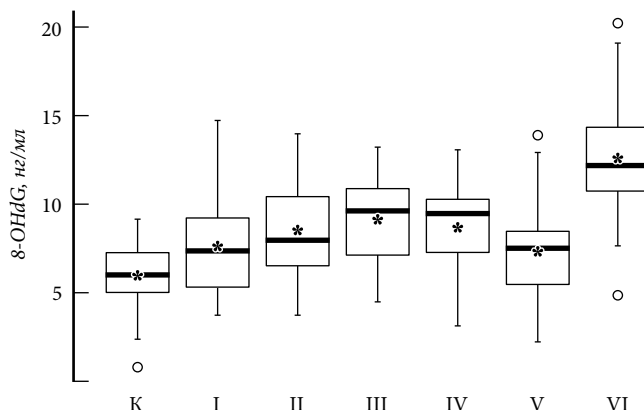


Рис. 5. Содержание 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина в сыворотке крови в зависимости от типа гепатита и степени фиброза:

К - контроль, I - ХВГ В (F0), II - ХВГ В (F1-2), III - ХВГ В (F3-4), IV - ХВГ С (F0), V - ХВГ С (F1-2), VI - ХВГ С (F3-4).

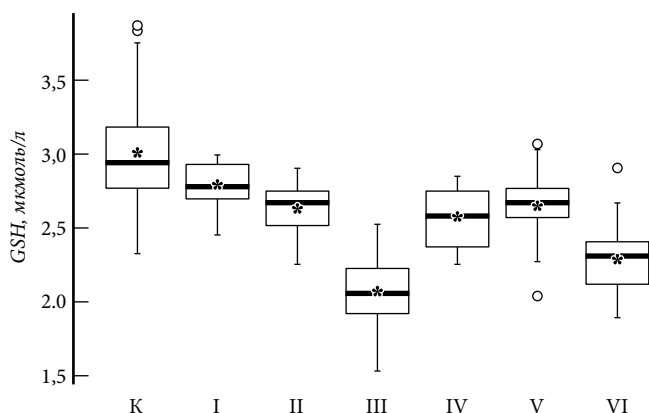


Рис. 6. Содержание восстановленного глутатиона в сыворотке крови в зависимости от типа гепатита и степени фиброза:

K – контроль, *I* – ХВГ В (F0), *II* – ХВГ В (F1–2), *III* – ХВГ В (F3–4), *IV* – ХВГ С (F0), *V* – ХВГ С (F1–2), *VI* – ХВГ С (F3–4).

ДНК в хвосте комет лимфоцитов (значимы различия между всеми парами стадий фиброза), содержание в сыворотке крови МДА и 4-гидрокси-2,3-ноненаля (существенные изменения регистрировались при F3–4: значимые отличия от F0 и F1–2, при том, что различия между F0 и F1–2 оказались несущественными).

При ХВГ С связаны со стадией фиброза были уровни 8-нитрогуанина, 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина и доли ДНК в хвосте комет лимфоцитов (по остальным показателям подобных связей не обнаружено). Существенные изменения ОАА и уровней восстановленного глутатиона, МДА и 4-гидрокси-2,3-ноненаля в сыворотке крови регистрировались на стадии F3–4: значимые отличия от F0 и F1–2, при том, что различия между F0 и F1–2 оказались несущественными.

По умершим был проведен дескриптивный анализ, аналогичный тому, результаты которого представлены выше для живых пациентов. По аналогии, итоги тестов на сравнение средних значений показателей между различными группами умерших можно, кроме возраста, условно разделить на несколько категорий. При этом из-за малого размера выборки в качестве порогового уровня значимости использовано значение в 10% вместо 5% (табл. 1, 2).

Значимых различий в зависимости ни от типа гепатита для одинаковой степени фиброза печени, ни от степени фиброза для одинаковых типов гепатита по содержанию в крови 4-гидрокси-2,3-ноненаля не обнаружено. По данному показателю были значимые различия между контролем и группами с ХВГ В (F3–4) и ХВГ С (F3–4). Также обнаружены значимые различия в степени фиброза при одинаковых типах гепатита, но не между группами с ХВГ В и ХВГ С при одинаковой степени фиброза (табл. 1, 2):

- ♦ для ОАА в сыворотке крови при ХВГ С – между F3–4 и F0, и контролем;
- ♦ для восстановленного глутатиона в сыворотке крови при ХВГ С – между F3–4 и F0;
- ♦ для МДА в сыворотке крови при обоих типах гепатита – между F3–4 и F0, и контролем;

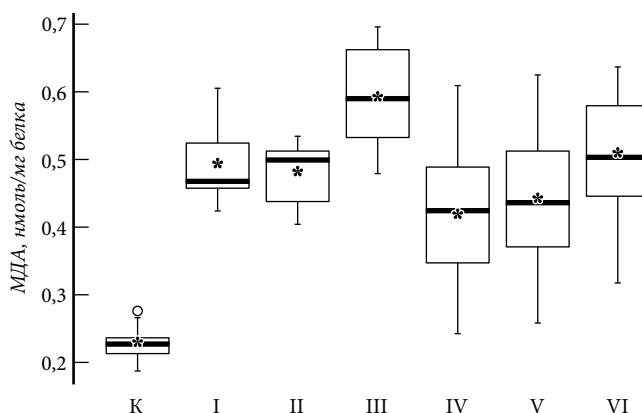


Рис. 7. Содержание МДА в сыворотке крови в зависимости от типа гепатита и степени фиброза:

K – контроль, *I* – ХВГ В (F0), *II* – ХВГ В (F1–2), *III* – ХВГ В (F3–4), *IV* – ХВГ С (F0), *V* – ХВГ С (F1–2), *VI* – ХВГ С (F3–4).

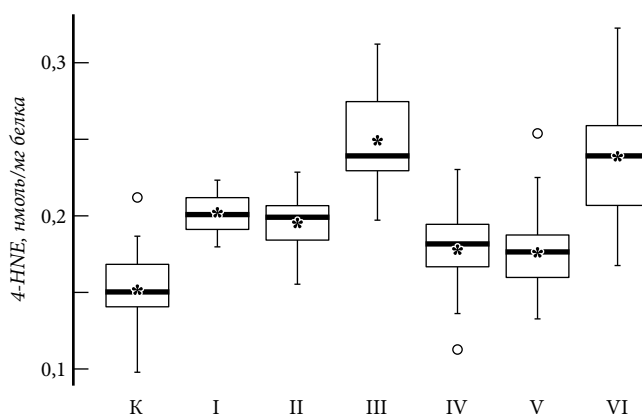


Рис. 8. Содержание 4-гидрокси-2,3-ноненаля в сыворотке крови в зависимости от типа гепатита и степени фиброза:

K – контроль, *I* – ХВГ В (F0), *II* – ХВГ В (F1–2), *III* – ХВГ В (F3–4), *IV* – ХВГ С (F0), *V* – ХВГ С (F1–2), *VI* – ХВГ С (F3–4).

- ♦ для МДА в ткани печени при ХВГ В – между F3–4 и остальными группами, включая контроль, при ХВГ С – между F3–4 и F0, и контролем;
- ♦ для 8-нитрогуанана в ткани печени при ХВГ С – между F3–4 и остальными группами, включая контроль, при ХВГ С – между F3–4 и F0, и F1–2;
- ♦ для доли ДНК в хвосте комет гепатоцитов при обоих типах гепатита – между всеми парами стадий фиброза печени, а также в парах отдельных стадий с контролем.

То есть можно предположить, что эти показатели связаны со стадией фиброза, но не сопряжены с типом гепатита. Для показателей, по которым зарегистрированы статистически значимые различия между контролем и группами с F0 (МДА в крови и ткани печень, % ДНК в хвосте комет гепатоцитов (только при ХВГ В), можно предположить, что изменения наступают еще на стадии F0, то есть связаны с наличием гепатита как такового.

Заметим, что по следующим показателям обнаружены значимые различия между группами пациентов с одинаковой стадией фиброза, но разными типами гепатита (табл. 1, 2):

Таблица 1

Значимость различий в средних показателях между группами умерших пациентов в зависимости от типа гепатита и степени фиброза в сыворотке крови

Показатель ^a	Группа	M	s	p-value тестов Манна-Уитни с коррекцией Холма							
				Контроль	ХВГ В			ХВГ С			
					F0	F1-2	F3-4	F0	F1-2		
ОАА, ммоль/л	Контроль	2,2	0,8								
	ХВГ В	F0	1,5	0,3	0,374						
		F1-2	2,0	0,3	1	0,77					
		F3-4	1,5	0,6	0,432	1	1				
	ХВГ С	F0	2,0	0,1	1	0,114	1	0,77			
		F1-2	1,6	0,6	0,705	1	1	1	0,936		
F3-4		1,2	0,4	0,063 ⁶	1	0,126	1	0,08 ⁶	1		
8-NO ₂ G, нг/мл	Контроль	0,1	0,0								
	ХВГ В	F0	0,2	0,0	<0,00 ⁶						
		F1-2	0,3	0,1	<0,001 ⁶	0,125					
		F3-4	0,4	0,0	<0,001 ⁶	0,048 ⁶	0,048 ⁶				
	ХВГ С	F0	0,2	0,0	<0,001 ⁶	0,519	0,256	0,048 ⁶			
		F1-2	0,4	0,1	<0,001 ⁶	0,08 ⁶	0,519	0,519	0,096 ⁶		
F3-4		0,6	0,1	<0,001 ⁶	0,045 ⁶	0,045 ⁶	0,048 ⁶	0,045 ⁶	0,084 ⁶		
8-OHdG, нг/мл	Контроль	6,2	0,9								
	ХВГ В	F0	7,7	0,4	0,016 ⁶						
		F1-2	8,1	0,4	<0,001 ⁶	0,165					
		F3-4	9,1	0,6	<0,001 ⁶	0,048 ⁶	0,08 ⁶				
	ХВГ С	F0	11,1	1,2	<0,001 ⁶	0,048 ⁶	0,048 ⁶	0,06 ⁶			
		F1-2	12,4	0,9	<0,001 ⁶	0,048 ⁶	0,048 ⁶	0,048 ⁶	0,165		
F3-4		13,6	1,7	<0,001 ⁶	0,045 ⁶	0,045 ⁶	0,045 ⁶	0,088 ⁶	0,253		
GSH, мкмоль/л	Контроль	2,5	0,7								
	ХВГ В	F0	2,4	0,1	1						
		F1-2	2,4	0,1	1	1					
		F3-4	2,1	0,3	0,924	0,555	0,715				
	ХВГ С	F0	2,4	0,2	1	1	1	0,555			
		F1-2	2,3	0,2	1	1	1	1	1		
F3-4		1,8	0,2	0,187	0,063 ⁶	0,063 ⁶	0,288	0,063 ⁶	0,126		
4-HNE, нмоль/мл белка	Контроль	0,2	0,0								
	ХВГ В	F0	0,2	0,0	1						
		F1-2	0,2	0,0	1	1					
		F3-4	0,3	0,1	0,021 ⁶	0,114	0,16				
	ХВГ С	F0	0,2	0,0	1	1	1	0,114			
		F1-2	0,2	0,0	0,924	0,832	1	0,114	1		
F3-4		0,3	0,1	0,06 ⁶	0,16	1	1	0,448	1		
МДА, нмоль/мл белка	Контроль	0,3	0,0								
	ХВГ В	F0	0,4	0,1	0,017 ⁶						
		F1-2	0,5	0,0	<0,001 ⁶	0,135					
		F3-4	0,5	0,0	<0,001 ⁶	0,056 ⁶	1				
	ХВГ С	F0	0,4	0,1	0,032 ⁶	1	0,39	0,18			
		F1-2	0,5	0,1	<0,001 ⁶	0,056 ⁶	1	1	0,175		
F3-4		0,6	0,1	<0,001 ⁶	0,045 ⁶	0,11	0,11	0,056 ⁶	0,135		
%DNAt	Контроль	3,8	1,7								
	ХВГ В	F0	5,1	0,8	0,06 ⁶						
		F1-2	7,9	1,6	0,034 ⁶	0,05 ⁶					
		F3-4	14,7	3,9	<0,001 ⁶	0,048 ⁶	0,048 ⁶				
	ХВГ С	F0	10,5	2,2	0,018 ⁶	0,048 ⁶	0,234	0,234			
		F1-2	15,8	2,1	<0,001 ⁶	0,048 ⁶	0,048 ⁶	0,631	0,048 ⁶		
F3-4		21,2	1,8	<0,001 ⁶	0,048 ⁶	0,048 ⁶	0,048 ⁶	0,048 ⁶	0,048 ⁶		

^a 8-NO₂G – 8-нитрогуанан, 8-OHdG – 8-гидрокси-2-дезоксигуанозин, GSH – восстановленный глутатион, 4-HNE – 4-гидрокси-2,3-ноненаль, %DNAt – доля ДНК-комет в хвосте лимфоцита.

⁶ p-value <10%.

Таблица 2

Значимость различий в средних показателях между группами умерших пациентов в зависимости от типа гепатита и степени фиброза в гомогенате ткани печени

Показателя	Группа	M	s	p-value тестов Манна-Уитни с коррекцией Холма						
				Контроль	ХВГ В			ХВГ С		
					F0	F1-2	F3-4	F0	F1-2	
ОАА, ммоль/л	Контроль	19,4	2,0							
	ХВГ В	F0	12,4	1,8	<0,001 ⁶					
		F1-2	15,5	1,8	0,018 ⁶	0,12				
		F3-4	10,6	2,1	<0,001 ⁶	0,75	0,06 ⁶			
	ХВГ С	F0	19,5	0,8	1	0,056 ⁶	0,056 ⁶	0,056 ⁶		
		F1-2	14,0	2,7	0,018 ⁶	1	1	0,468	0,056 ⁶	
F3-4		9,7	1,5	<0,001 ⁶	0,12	0,048 ⁶	1	0,048 ⁶	0,09 ⁶	
8-NO ₂ G, нг/мл	Контроль	1,9	0,6							
	ХВГ В	F0	2,0	0,0	1					
		F1-2	2,0	0,1	1	1				
		F3-4	2,7	0,3	0,104	0,064 ⁶	0,064 ⁶			
	ХВГ С	F0	1,9	0,2	1	1	1	0,064 ⁶		
		F1-2	2,3	0,2	0,423	0,896	0,624	0,275	0,37	
F3-4		3,6	0,6	<0,001 ⁶	0,06 ⁶	0,06 ⁶	0,264	0,06 ⁶	0,06 ⁶	
8-OHdG, нг/мл	Контроль	26,1	3,6							
	ХВГ В	F0	71,6	4,3	<0,001 ⁶					
		F1-2	74,9	4,8	<0,001 ⁶	0,796				
		F3-4	80,8	4,1	<0,001 ⁶	0,052 ⁶	0,545			
	ХВГ С	F0	51,7	11,9	0,016 ⁶	0,052 ⁶	0,052 ⁶	0,052 ⁶		
		F1-2	68,4	9,0	<0,001 ⁶	0,796	0,796	0,12	0,222	
F3-4		83,7	4,5	<0,001 ⁶	0,045 ⁶	0,12	0,796	0,045 ⁶	0,09 ⁶	
GSH, мкмоль/л	Контроль	23,5	2,0							
	ХВГ В	F0	19,4	0,8	0,018 ⁶					
		F1-2	18,1	1,1	<0,001 ⁶	0,385				
		F3-4	14,6	1,4	<0,001 ⁶	0,06 ⁶	0,09 ⁶			
	ХВГ С	F0	22,6	1,9	1	0,06 ⁶	0,06 ⁶	0,06 ⁶		
		F1-2	16,8	2,5	0,018 ⁶	0,385	1	0,545	0,06 ⁶	
F3-4		15,3	2,7	<0,001 ⁶	0,06 ⁶	0,256	1	0,048 ⁶	1	
4-HNE, нмоль/мг белка	Контроль	4,8	0,4							
	ХВГ В	F0	6,1	0,5	0,018 ⁶					
		F1-2	7,2	0,6	<0,001 ⁶	0,15				
		F3-4	10,1	2,3	<0,001 ⁶	0,056 ⁶	0,056 ⁶			
	ХВГ С	F0	4,7	0,8	1	0,09 ⁶	0,056 ⁶	0,056 ⁶		
		F1-2	6,6	1,3	0,105	0,8	1	0,096	0,275	
F3-4		10,6	2,5	<0,001 ⁶	0,051 ⁶	0,051 ⁶	1	0,051 ⁶	0,056 ⁶	
МДА, нмоль/мг белка	Контроль	20,7	6,6							
	ХВГ В	F0	54,2	4,7	<0,001 ⁶					
		F1-2	58,0	7,1	<0,001 ⁶	1				
		F3-4	70,7	6,8	<0,001 ⁶	0,052 ⁶	0,135			
	ХВГ С	F0	48,4	2,2	<0,001 ⁶	0,259	0,259	0,052 ⁶		
		F1-2	55,2	4,9	<0,001 ⁶	1	1	0,052 ⁶	0,259	
F3-4		67,9	4,5	<0,001 ⁶	0,045 ⁶	0,135	1	0,045 ⁶	0,052 ⁶	
%DNAt	Контроль	19,9	6,6							
	ХВГ В	F0	27,3	1,7	0,096					
		F1-2	34,0	1,9	0,019 ⁶	0,052 ⁶				
		F3-4	42,6	5,7	<0,001 ⁶	0,052 ⁶	0,052 ⁶			
	ХВГ С	F0	23,2	3,9	0,37	0,234	0,052 ⁶	0,052 ⁶		
		F1-2	33,1	2,9	0,019 ⁶	0,06 ⁶	0,522	0,052 ⁶	0,052 ⁶	
F3-4		48,9	2,4	<0,001 ⁶	0,051 ⁶	0,051 ⁶	0,184	0,051 ⁶	0,051 ⁶	

^a 8-NO₂G – 8-нитрогуанан, 8-OHdG – 8-гидрокси-2-дезоксигуанозин, GSH – восстановленный глутатион, 4-HNE – 4-гидрокси-2,3-ноненаль, %DNAt – доля ДНК-комет в хвосте гепатоцита.

⁶ p-value <10%.

- ♦ для 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина сыворотки крови и для % ДНК в хвосте комет лимфоцитов (для всех значений F);
- ♦ для 8-нитрогуанана сыворотки крови (только для F3–4);
- ♦ для ОАА, 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина, восстановленного глутатиона и 4-гидрокси-2,3-ноненаля ткани печени (только для F0).

То есть значения этих показателей, возможно, были соотнесены не только с наличием ХВГ и стадией фиброза, но и с типом ХВГ.

В целом, внутри группы пациентов с ХВГ В со стадией фиброза оказались связаны следующие показатели (табл. 1, 2):

- ♦ 8-нитрогуанан и 8-гидрокси-2-дезоксигуанозин сыворотки крови, восстановленных глутатион и 4-гидрокси-2,3-ноненаль ткани печени, % ДНК в хвосте комет лимфоцитов и гепатоцитов (значимы различия между всеми парами F);
- ♦ 4-гидрокси-2,3-ноненаль сыворотки крови, 8-нитрогуанан и МДА ткани печени (значимы только различия между F3–4 и F0, и F1–2);
- ♦ МДА сыворотки крови (значимы только различия между F0 и F1–2, и F3–4);
- ♦ ОАА ткани печени (значимы различия между F0 и F1–2, а также между F3–4 и F1–2);
- ♦ 8-нитрогуанан ткани печени (значимы различия только между F3–4 и F0).

В целом, внутри группы пациентов с ХВГ С связаны со стадией фиброза были следующие показатели (табл. 1, 2):

- ♦ уровни 8-нитрогуанана и МДА сыворотки крови, ОАА, 8-нитрогуанана, 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина, 4-гидрокси-2,3-ноненаля и МДА ткани печени, % ДНК в хвостах комет лимфоцитов и гепатоцитов (значимы различия между всеми парами F);
- ♦ уровень восстановленного глутатиона сыворотки крови (значимы различия между F3–4 и F0, и F1–2);
- ♦ уровень восстановленного глутатиона ткани печени (значимы различия между F0 и F1–2, и F3–4);
- ♦ уровни ОАА, 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина и 4-гидрокси-2,3-ноненаля сыворотки крови (значимы различия между F3–4 и F0).

Заметим, что различия между показателями крови и показателями ткани печени абсолютно по всем параметрам, как в целом по выборке умерших, так и по отдельным ее подгруппам, статистически значимы.

Между живыми и умершими пациентами было проведено сравнение средних значений по следующим показателям сыворотки крови: ОАА, 8-нитрогуанан, 8-гидрокси-2-дезоксигуанозин, восстановленный глутатион, 4-гидрокси-2,3-ноненаль, МДА и % ДНК в хвосте комет. В целом, значимые различия между живыми и умершими обнаруживались только:

- ♦ по 8-гидрокси-2-дезоксигуанозину между контрольными и пациентами с ХВГ С с F0 или F1–2;
- ♦ по восстановленному глутатиону среди всех пациентов, а также среди пациентов контрольной группы, пациентов с ХВГ В (в том числе со стадией F0 или

F1–2), а также среди пациентов с ХВГ С и стадией F1–2 или F3–4;

- ♦ по 4-гидрокси-2,3-ноненалу среди всех пациентов, а также среди пациентов контрольной группы, пациентов с ХВГ В (в том числе со стадией F3–4), а также пациентов с ХВГ С со стадией F1–2;
- ♦ по МДА среди пациентов с ХВГ В (в том числе со стадией F0 или F3–4) или с ХВГ С (в том числе со стадией F3–4).

Следует обратить внимание на то, что эти различия зафиксированы при том, что группы умерших и живых лиц существенно различались по возрасту. Если уровень перечисленных показателей связан с возрастом пациента, тогда указанные различия могут, по крайней мере отчасти, объясняться разницей в возрасте, а не статусом индивида (жив/мертв).

Обсуждение полученных данных

Характеризуя состояние ДНК, как в целом макроорганизма, так и отдельно лимфоцитов следует заметить несколько важных моментов. Во-первых, непосредственно степень повреждения ДНК лимфоцитов периферической крови достоверно отличалась от контрольных цифр даже при отсутствии изменений в ткани печени. Причем на аналогичных стадиях фиброза параметры между типами гепатита были разными. Наименьший % ДНК в хвосте комет имели пациенты с ХВГ В – 5,1 (против 12,7% при ХВГ С). Также следует заметить, что с прогрессированием заболевания степень деструкции ДНК в этих двух группах не выравнивалась. Значения, характеризующие стадию цирроза печени при ХВГ В, практически сопоставимы со стадией F0 при ХВГ С. Из чего следует вывод о большей генотоксичности вируса гепатита С [1, 3].

Во-вторых, динамика изменений уровня маркеров оксидативного и нитрозативного повреждения ДНК – 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина и 8-нитрогуанана – в целом соответствует таковой в отношении степени деструкции ДНК [2]. Таким образом, мы можем говорить о значимом вкладе в деструкцию процессов оксидативного и нитрозативного стрессов [11, 14] (причем эти изменения начинались до формирования фиброза у пациентов обеих групп).

В-третьих, буферная емкость антиоксидантной системы организма в ходе естественного течения вирусных гепатитов истощается. Об этом свидетельствует отрицательная динамика интегративного показателя – ОАА, включающего в себя как низкомолекулярные антиоксиданты, так и высокофункциональные белковые молекулы. При ХВГ С, очевидно в силу большей генотоксичности вируса и индукции более выраженного оксидативного и нитрозативного стресса, антиоксиданты истощаются быстрее. Такая же тенденция характерна и для восстановленного глутатиона [13, 14].

Несмотря на это, другой показатель – МДА, косвенно характеризующий процесс перекисного окисления липидов, имел несколько иную динамику. Существенное увеличение его концентрации было характерно для

пациентов с ХВГ В, причем межгрупповые отличия с ХВГ С здесь оказались статистически значимы. Следует заметить, что оксидативный стресс помимо окисления липидов включает в себя окисление и нуклеиновых кислот, и углеводов, и отдельных компонентов клетки.

В-четвертых, оксидативный и нитрозативный стресс вызывает в клетке значимые нарушения целостности многих мембранных органелл. Так, при окислении специфического липида мембран митохондрий – кардиолипина – обнаруживается 4-гидрокси-2,3-нонeналь. Динамика его накопления в крови при вирусных гепатитах имеет тенденцию к постепенному увеличению по мере усиления фиброза. Причем межгрупповые отличия на одинаковых стадиях фиброза при разных типах гепатита оказываются недостоверными [13].

Изменения в ткани печени при хронических вирусных гепатитах в целом сопоставимы с таковыми в сыворотке крови по всем показателям. Но ввиду большей концентрации ферментов и продуктов окисления непосредственно внутри клеток значения каждого из параметров закономерно в несколько раз выше таковых в сыворотке крови.

Литература / References

1. Кропотов А.В., Челомин В.П., Слободскова В.В. [и др.]. Оценка генотоксичности тетрахлоорметана и защитного действия силибинина и хаурантина с помощью метода ДНК-комет в печени крыс // Тихоокеанский мед. журнал. 2013. № 2. С. 63–66. Kropotov A.V., Chelomin V.P., Slobodskova V.V. [et al.]. Estimating carbon tetrachloride toxicity and protective action of silibinin and haurantin using DNA-comet assay in rat liver // Pacific Medical Journal. 2013. No. 2. P. 63–66.
2. Михайлов А.О., Попов А.Ф., Иванова Н.С. [и др.]. Деструкция, окисление ДНК и липидов мембран митохондрий при хронических вирусных гепатитах С, В // Инфекционные болезни. 2018. Т. 16, № 1. С. 15–21. Mikhaylov A.O., Popov A.F., Ivanova N.S. [et al.]. Destruction, oxidation of DNA and lipids of mitochondrial membranes in chronic viral hepatitis C, B // Infectious Diseases. 2018. Vol. 16, No. 1. P. 15–21.
3. Михайлов А.О., Попов А.Ф., Иванова Н.С., Симакова А.И. Исследование повреждений ДНК лимфоцитов у больных хроническим вирусным гепатитом в методом ДНК-комет // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2017. Т. 22, № 2. С. 64–68. Mikhaylov A.O., Popov A.F., Ivanova N.S., Simakova A.I. The investigation of DNA damage in lymphocytes by comet assay in chronic viral hepatitis B patients // Epidemiology and Infectious Diseases. 2017. Vol. 22, No. 2. P. 64–68.
4. Михайлов А.О., Попов А.Ф., Иванова Н.С., Симакова А.И. Повреждения ДНК лимфоцитов при хронических вирусных гепатитах В, С // Журнал инфектологии. 2017. Т. 9, № 2. С. 29–36. Mikhaylov A.O., Popov A.F., Ivanova N.S., Simakova A.I. DNA damage in lymphocytes in chronic viral hepatitis B, C // Journal Infectology. 2017. Vol. 9, No. 2. P. 29–36.
5. Попов А.Ф., Михайлов А.О., Иванова Н.С., Симакова А.И. Метод ДНК-комет в диагностике фиброза печени при хроническом вирусном гепатите С // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2015. Т. 20, № 2. С. 29–33. Popov A.F., Mikhaylov A.O., Ivanova N.S., Simakova A.I. Method of DNA-comet assay in the diagnosis of liver fibrosis in patients with chronic viral hepatitis C // Epidemiology and Infectious Diseases. 2015. Vol. 20, No. 2. P. 29–33.
6. Чернигина И.А., Щербатюк Т.Г. Новая версия метода ДНК-комет // Современные технологии в медицине. 2016. Т. 8, № 1. С. 20–27. Chernigina I.A., Shcherbatyuk T.G. A new version of comet assay // Modern Technologies in Medicine. 2016. Vol. 8, No. 1. P. 20–27.

7. Bolukbas C., Bolukbas F.F., Kocyigit A. [et al.]. Relationship between levels of DNA damage in lymphocytes and histopathological severity of chronic hepatitis C and various clinical forms of hepatitis B // J. Gastroenterol. Hepatol. 2006. Vol. 21, No. 3. P. 610–616.
8. Cao L., Quan Xi-B., Zeng W.-J. [et al.]. Mechanism of hepatocyte apoptosis // J. Cell Death. 2016. No. 9. P. 19–29.
9. Grossi S., Sumberaz A., Gosmar M. [et al.]. DNA damage in peripheral blood lymphocytes of patients with cirrhosis related to alcohol abuse or to hepatitis B and C viruses // Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 2008. Vol. 20, No. 1. P. 22–25.
10. Ivanov A.I., Valuev-Elisston V.T., Tyurina D.A. [et al.]. Oxidative stress, a trigger of hepatitis C and B virus-induced liver carcinogenesis // Oncotarget. 2017. Vol. 8, No. 3. P. 3895–3932.
11. Iwakiri Ya. Nitric oxide in liver fibrosis: The role of inducible nitric oxide synthase // Clin. Mol. Hepatol. 2015. Vol. 21, No. 4. P. 319–325.
12. Iwakiri Ya., Kim M.Y. Nitric oxide in liver diseases // Trends Pharmacol. Sci. 2015. Vol. 36, No. 8. P. 524–536.
13. Kawanishi S., Ohnishi S., Ma N. [et al.]. Nitrate and oxidative DNA damage in infection-related carcinogenesis in relation to cancer stem cells // Genes and Environment. 2016. doi: 10.1186/s41021-016-0070-8 (date of access: 03.08.2018).
14. Li P., Ramm G.A., Macdonald G.A. Value of the 8-oxodG/dG ratio in chronic liver inflammation of patients with hepatocellular carcinoma // Redox Biology. 2016. doi: 10.1016/j.redox.2016.02.003 (date of access: 03.08.2018).
15. Olive P.L., Banáth J.P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells // Nature Protocols. 2006. Vol. 1, No. 1. P. 23–29.

Поступила в редакцию 19.09.2018.

OXIDATIVE AND NITROSATIVE DNA DAMAGE IN HEPATIC FIBROSIS PATHOGENESIS IN CHRONIC VIRAL HEPATITIS

A.O. Mikhaylov¹, A.F. Popov², V.A. Ivanis², E.V. Khamueva¹, N.S. Ivanova², A.I. Simakova²

¹ Regional Clinical Hospital No. 2 (55 Russkaya St. Vladivostok 690105 Russian Federation), ² Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 690002 Russian Federation)

Objective. Despite a large number of studies on chronic viral hepatitis, many issues related to its pathogenesis remain unsettled. First of all, it refers to pathogenic effects of the viruses themselves, the nature and patterns of the host organism's response to the pathogen, the formation of liver cirrhosis, hepatocellular carcinoma, and several other aspects.

Methods. In the serum of 150 patients with chronic viral hepatitis B and C and in the serum and in the liver homogenates taken after 31 autopsies of persons who died of cirrhosis in the outcome of chronic viral hepatitis, the total antioxidant activity was studied, the content of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine, 8-nitroguanine, reduced glutathione, malonic dialdehyde and 4-hydroxy-2,3-nonenal. Also, the degree of DNA destruction in peripheral blood lymphocytes and hepatocytes was analyzed using the comet assay.

Results. It has been established that DNA destruction of hepatocytes and peripheral blood lymphocytes is one of the leading components of the formation of hepatic fibrosis in chronic viral hepatitis B and C and can be considered as its pathognomonic marker. One of the leading mechanisms of this process can be called the enhancement of oxidative and nitrosative processes.

Conclusions. There is a direct link between DNA damage and the severity of sclerotic changes in the liver. Oxidative and nitrosative stress in hepatocytes and lymphocytes causes significant violations of the integrity of membrane organelles. Biochemical changes in the liver tissue during chronic viral hepatitis B and C are generally comparable to those in the serum in all respects, which makes them promising in terms of developing algorithms for diagnosing hepatic fibrosis.

Keywords: DNA comet assay, oxidative and nitrosative stress, hepatocytes, lymphocytes

УДК 616.311.2–002-022.7:579.844.13

DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2018.4.71–74

Эпидемиология неспецифических пародонтитов, вызванных бактериями рода *Leptotrichia*, при хроническом и рецидивирующем течении инфекции

Н.В. Стрельникова^{1,2}, А.А. Антонова¹, В.Б. Туркутюков³, Е.С. Шаповаленко¹¹ Дальневосточный государственный медицинский университет (680000, г. Хабаровск, ул. Муравьева–Амурского, 35),² Краевая клиническая больница № 1 (680009, г. Хабаровск, ул. Краснодарская, 9),³ Тихоокеанский государственный медицинский университет (690002, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Проведен ретроспективный эпидемиологический анализ микробиоценоза патологических зубодесневых карманов (ПЗДК) при неспецифических пародонтитах у 432 пациентов старше 20 лет. Установлено выраженное видовое разнообразие облигатных и факультативных анаэробов при тяжелых пародонтитах и пародонтитах средней тяжести по сравнению с микробиоценозом ПЗДК при острых пародонтитах легкой степени. Бактерии рода *Leptotrichia* выявлялись при всех пародонтитах и нередко – в составе микробных ассоциаций со *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pyogenes*, поддерживая хронический рецидивирующий процесс. Результаты исследования позволяют рекомендовать применение эмпирического лечения пародонтита антибактериальными химиопрепаратами, действующими на неспорообразующие анаэробные бактерии.

Ключевые слова: периодонтит, патологический зубодесневой карман, лептотрихии, микробиоценоз

Проблема неспецифических хронических и рецидивирующих воспалительных заболеваний тканей пародонта, развивающихся на фоне соматических заболеваний, и сегодня остается высокоактуальной [2, 4, 14, 15]. В Российской Федерации распространенность этой патологии достигает 60–98% [5–8]. В Хабаровском крае кровоточивость десен у детей, как первый признак воспаления пародонта, регистрируется с 6–7 лет [1], а наиболее высока потребность в пародонтологическом лечении определяется среди лиц старше 60 лет [5–8, 13].

Изучение микробиоценоза патологических зубодесневых карманов (ПЗДК) имеет практическую значимость. Установлено, что условно-патогенные бактерии полости рта, включая пародонтопатогенные виды, вызывают тяжелую форму оппортунистической инфекции в ткани пародонта, так как процесс здесь протекает с участием резидентных облигатных анаэробов, формирующих в биопленке пародонтального кармана агрессивные ассоциации [6, 7, 11, 12, 15]. В то же время в исследованиях, посвященных этому вопросу, как правило, не представлена микробиологическая характеристика ПЗДК с учетом индигенных бактерий полости рта и не выполняется сравнительная оценка микробного статуса при пародонтитах различной тяжести, особенно с точки зрения смены представителей оральной нормофлоры при утяжелении и рецидивирующем течении заболевания.

В большом количестве *Leptotrichia* spp. обнаруживаются в зубном камне, на поверхности языка, у шейки зуба в десневом желобке. По типу дыхания это обычно анаэробы, которые растут в аэробных условиях в присутствии 5% CO₂, как аэротолерантные изоляты. Бактерии *Leptotrichia* относятся к неспорообразующим анаэробным микроорганизмам.

Стрельникова Наталья Викторовна – канд. мед. наук, доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ДВГМУ, заведующая бактериологической лабораторией ККБ № 1; e-mail: jpdom@mail.ru

За счет бактериального синергизма лептотрихии способны вызывать разнообразные по клинике и исходам процессы, протекающие в 25–80% случаев как смешанная аэробно-анаэробная инфекция. Описаны ассоциации *Leptotrichia* spp. со *Staphylococcus aureus* при лептотрихиозе миндалин и с *Candida albicans* – при различных воспалительных заболеваниях полости рта [10].

Клинически значимые виды неспорообразующих анаэробов представлены бактероидами, превотеллами, порфиромонадами, фузобактериями, пептококками, пептострептококками. Типовые виды: *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella melaninogenica*. Лептотрихии с фузобактериями вызывают язвенно-некротический гингивит, с быстрым массивным изъязвлением слизистых оболочек в результате срыва колонизационной резистентности. Фузобактерии в ассоциации с другими анаэробами служат причиной гингивитов, стоматитов, плевропневмоний и остеомиелитов. *P. gingivalis* и *P. melaninogenica* по определению ВОЗ – ведущие пародонтопатогенные микроорганизмы [3, 6, 10].

Лептотрихии выделяют из клинических образцов при некротизирующем язвенном гингивите, ювенильном периодонтите и периодонтитах взрослых, язвенно-некротической ангине Венсана. Эти микроорганизмы способны играть определенную роль в невынашивании беременности и преждевременных родах. Они вызывают ному, острый аппендицит, бактериальные вагинозы, целлюлит, гангренозный мягкий шанкр, сальпингит, колонизируют импланты зубов, обнаруживаются в перитонеальной жидкости у пациентов с нейтропенией при ВИЧ-инфекции, бактериальным эндокардитом и лейкозами [10].

Leptotrichia spp. присутствуют в полости рта постоянно, чаще у шейки зубов, в количестве 10³–10⁴/мл слюны, в составе зубной бляшки. Органическая основа

(матрикс) зубного камня состоит главным образом из этих бактерий, при заболеваниях пародонта их количество возрастает. Лептотрихии активно ферментируют глюкозу с образованием большого количества молочной кислоты, что способствует понижению водородного показателя среды до 4,5–5 [9, 10]. Они могут непосредственно вовлекаться в процесс гниения и распада тканей зубов и пародонта, кариеса [10, 13, 14]. В Хабаровске в 1999–2008 гг. показатели заболеваемости лептотрихозом слизистых оболочек полости рта среди детей до 2 лет в среднем равнялись 3,83 и 3–14 лет – 3,19 на 100 000 соответствующего населения. Показатель многолетней встречаемости в группе взрослых (19–76 лет) доходил до 33,55 на 100 000 населения, средние показатели увеличивались по экспоненте с возрастом, особенно после 46 лет [10].

Цель настоящего исследования – оценка эпидемиологической значимости бактерий рода *Leptotrichia* в развитии гнойно-септических инфекций ротовой полости.

Материал и методы

У 432 пациентов стоматологической клиники «Унистом» ДВГМУ (г. Хабаровск) проведено микробиологическое исследование содержимого пародонтальных карманов. Для выявления особенностей микробиоценоза ПЗДК при пародонтитах сформированы три клинических группы: основная, контрольная и сравнения. В основную группу вошли 183 человека с хроническими пародонтитами средней степени тяжести, в группу сравнения – 95 человек с тяжелым течением хронического рецидивирующего пародонтита. Контрольную группу методом случайной выборки сформировали из 154 пациентов с острыми пародонтитами легкой степени. Оценка стоматологического статуса осуществлялась по стандартной методике. Все наблюдения распределены на ключевые возрастные группы по классификации ВОЗ: 20–34, 35–44, 45–59 и старше 60 лет. Определение видовой принадлежности клинически значимых условно-пародонтопатогенных штаммов проводилось в бактериологической лаборатории ККБ № 1 Министерства здравоохранения Хабаровского края и диагностической лаборатории «Юнилаб». Использовались бактериологический анализатор «Аутоскан-4», полимеразная цепная реакция в режиме реального времени и классические микробиологические методики.

Полученные данные выражали в виде средних и их стандартных ошибок ($M \pm s$), обрабатывали методами параметрической и непараметрической статистики, использовали корреляционный анализ: в зависимости от объема выборки и соответствия нормальному распределению для проверки силы и направления связи применяли коэффициенты корреляции Пирсона и Спирмена. Статистически значимыми считали результаты при $p \leq 0,05$, сильную положительную связь регистрировали при $r > 0,7$.

Результаты исследования

В 1-й и 2-й возрастных группах чаще диагностировался пародонтит легкой степени. С возрастом увеличивалась доля пародонитов средней степени тяжести. В 4-й возрастной группе преобладали среднетяжелые и тяжелые пародониты. То есть с возрастом пародонтологический статус статистически достоверно утяжеляется (табл. 1). Во всех возрастных группах отмечены признаки неудовлетворительной гигиены полости рта, индекс гигиены полости рта колебался от 1,55 до 2,33. При пародонтитах тяжелой степени гигиенический индекс был очень высоким – до 2,6. Среднее количество секстантов с патологическим карманами глубиной 4–5 мм увеличивалось от 0,04 в 1-й группе до 1,73 в 4-й возрастной группе. Патологические карманы глубиной 6 мм и более выявлены только в 3-й и 4-й группах. Среднее количество секстантов с карманами глубиной 6 мм и более увеличивалось с 0,49 в возрасте 45–59 лет до 0,54 в возрасте 60 лет и старше. Коэффициент ранговой корреляции Спирмена для этого показателя равнялся 0,8, что свидетельствовало о прямой сильной связи между индексом гигиены полости рта и количеством пораженных секстантов (табл. 2).

Гигиеническое состояние полости рта напрямую зависит от здоровья тканей пародонта, в том числе и за счет влияния биопленок микробиома ПЗДК и зубных отложений, которые способствуют воспалению. Анализ состава микробиоценоза свидетельствовал о том, что бактерии рода *Leptotrichia* легко вступали в ассоциации с пиогенными кокками без явлений антагонизма между культурами условно-патогенных бактерий из числа нормальной микрофлоры. Одновременно в ПЗДК выявлялись ассоциации микроорганизмов, от двух до четырех клинически значимых условно-пародонтопатогенных штаммов бактерий и дрожжеподобные грибы рода *Candida* (табл. 3).

Анализ микробной флоры ПЗДК показал, что ассоциация двух культур – *Leptotrichia* spp. и *Streptococcus pyogenes* – чаще встречалась при пародонтитах средней и тяжелой степени. Доминирующая ассоциация *Leptotrichia* spp. и *Staphylococcus aureus* регистрировалась в этой же ситуации примерно в половине случаев. Ассоциации со *Streptococcus viridans* и *Enterococcus faecalis* также чаще встречались при пародонтите средней

Таблица 1

Распространенность пародонитов в ключевых возрастных группах пациентов

Пародонтит	Кол-во наблюдений по возрастным группам (лет), %				
	20–34	35–44	45–59	≥60	Итого:
Легкий	88,0±2,4	74,0±4,4	34,0±2,2	15,0±3,0	36,0±5,3
Средний	12,0±2,4	20,0±3,6*	49,0±5,8*	47,0±5,8*	42,0±5,6
Тяжелый	–	6,0±1,4*	17,0±3,3*	37,0±5,4*	22,0±3,9

* Разница с частотой легкого пародонтита в пределах возрастной группы статистически значима.

Таблица 2

Среднее количество секстантов с признаками поражения пародонта в различных возрастных группах

Возраст, лет	Признак пародонтита, %					
	нет	кровоточивость десен	зубной камень	ПЗДК 4–5 мм	ПЗДК ≥6 мм	исключенные секстанты
20–34	2,28±0,12	2,63±0,12	1,04±0,08	0,04±0,01	–	0,01±0,00
35–44	2,36±0,14	1,92±0,06*	1,08±0,02	0,26±0,03	–	0,38±0,01
49–59	1,07±0,06*	2,56±0,10	1,33±0,03	0,04±0,01	0,49±0,03	0,51±0,02
≥60	0,71±0,04*	0,05±0,01*	0,61±0,02*	1,73±0,11*	0,54±0,01	2,36±0,22*

* Разница с группой «20–34 года» в пределах признака статистически значима.

Таблица 3

Ассоциации лептотрихий с условно-пародонтопатогенными штаммами бактерий в ПЗДК

Бактерия-ассоциант	Кол-во наблюдений в зависимости от тяжести пародонтита					
	легкий		средней тяжести		тяжелый	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
<i>S. pyogenes</i> гр. А	11	7,1±0,5	121	66,1±1,7	69	72,6±1,5
<i>S. viridans</i>	38	24,7±1,1	68	37,2±1,8	27	28,4±1,5
<i>S. anginosus</i>	28	18,2±1,1	43	23,5±1,4	11	11,6±0,8
<i>S. aureus</i>	39	25,3±1,4	79	43,2±1,9	48	50,5±1,9
<i>Escherichia coli</i>	–	–	28	15,3±0,9	20	21,0±1,3
<i>E. faecalis</i>	–	–	24	15,8±1,1	11	25,3±1,4

и тяжелой степени. По мере нарастания тяжести гнойно-септического процесса, *S. viridans* вытеснялся из ассоциаций в ПЗДК энтеробактериями и энтерококками (рис.).

Обсуждение полученных данных

Из представителей условно-патогенной нормофлоры *S. aureus*, продуцирующий большой спектр ферментов и факторов агрессии, выделялся на нашем материале в половине случаев при пародонтитах различной степени тяжести. Во всех наблюдениях определялось значительное доминирование фузобактерий рода *Leptotrichia*. Статистически значимым оказалось увеличение частоты выделения пиогенных стрептококков при утяжелении патологического процесса.

Streptococcus anginosus мог служить индикатором легкой степени поражения пародонта. *S. viridans* обнаруживался при всех вариантах пародонтита примерно с одинаковой частотой. Самостоятельную роль в патогенезе этого заболевания зеленящие стрептококки не играли, их участие рассматривалось как ассоциация резидентных непатогенных/малопатогенных обитателей полости рта.

E. faecalis – нормальный обитатель тонкого кишечника – не определялся при легких пародонтитах, присутствуя в ПЗДК только при среднетяжелом и тяжелом течении заболевания, при неудовлетворительной и плохой гигиене полости рта. Энтеробактерии *E. coli* также определялись при средней тяжести и тяжелом пародонтите. Таким образом, прослеживалась тенденция увеличения в два раза представительства энтерококков и кишечной палочки при утяжелении патологического процесса. Монокультуры из ПЗДК высевались редко, чаще обнаруживались ассоциации: две или три культуры (без учета роста грибов), а при тяжелой степени пародонтита – четыре или пять культур.

В оромикробиоценозе описано до 800 видов микробов, большинство из которых анаэробы [3, 6]. Максимальный титр фузобактерий рода *Leptotrichia*, 10⁵–10⁶ колониеобразующих единиц, определяется в межзубном промежутке, зубном камне и микробиоме корня языка, который отличается большим видовым разнообразием биопленки, что при снижении уровня иммунной резистентности служит дополнительным фактором риска с возможностью донации [3, 10]. Результаты исследования дают основание оценить

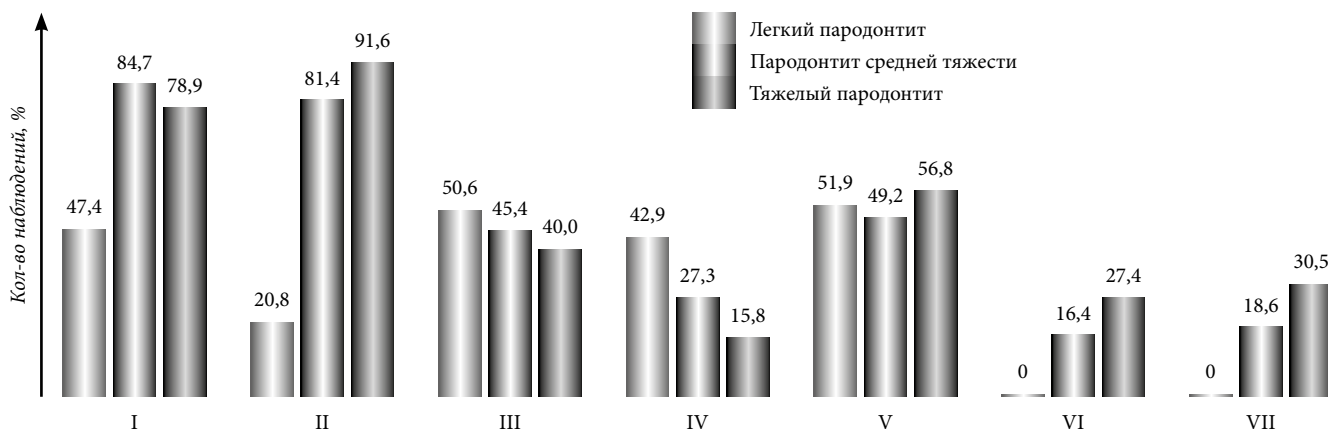


Рис. Микробиоценоз ПЗДК при пародонтитах:

I – *Leptotrichia* spp., II – *S. pyogenes* группы А, III – *S. viridans*, IV – *S. anginosus*, V – *S. aureus*, VI – *E. coli*, VII – *E. faecalis*.

степень патогенного потенциала лептотрихий в ассоциациях с пиогенными кокками и возможность их влияния на распространенность, тяжесть, хронизацию и рецидивирование неспецифического пародонтита, как классической оппортунистической аутоинфекции с эндогенным инфицированием нормальной микрофлорой, которая, попадая из соседних биотопов полости рта в ПЗДК, проявляет в ассоциациях высокую вирулентность и агрессивность при снижении и/или отсутствии факторов сдерживания.

Заключение

Состав микробиома ПЗДК у пациентов с пародонтитами средней и тяжелой степени характеризуется выраженным видовым разнообразием по сравнению с пародонтитами легкой степени. Обязательные *Leptotrichia* spp. и факультативные *S. pyogenes*, *S. aureus*, *E. faecalis*, анаэробные и другие условно-пародонтопатогенные бактерии чаще выделяются у пациентов со среднетяжелыми и тяжелыми пародонтитами, что позволяет в данной ситуации рекомендовать применение эмпирического лечения антибактериальными химиопрепаратами, действующими на анаэробную микрофлору.

Литература / References

1. Антонова А.А. Кариес зубов у детей в условиях микроэлементозов Хабаровского края: дис. ... д-ра мед. наук. Омск. 2006. 350 с.
Antonova A.A. Dental caries in children under microelementoses of the Khabarovsk Territory: Thesis MD. Omsk. 2006. 350 p.
2. Виноградова А.В., Кальк Е.А., Молоков В.Д. Новые подходы в лечении больных хроническим пародонтитом с применением реваascularизации костной ткани. Иркутск: ИНЦХТ. 2017. 123 с.
Vinogradova A.V., Kalk E.A., Molokov V.D. New approaches in the treatment of patients with chronic periodontitis with the use of bone tissue revascularization. Irkutsk: ISCST. 2017. 123 p.
3. Зеленова Е.Г. Микрофлора полости рта: норма и патология: учебное пособие. Н. Новгород: Изд-во НГМА. 2004. 158 с.
Zelenova E.G. Microflora of oral cavity: norm and pathology: A study guide. Nizhny Novgorod: NSMA Publishing House. 2004. 158 p.
4. Ковалевский А.М., Ковалевский В.А. Этиология и патогенез воспалительных заболеваний пародонта // Институт стоматологии. 2017. № 4. С. 88–90.
Kovalevsky A.M., Kovalevsky V.A. Etiology and pathogenesis of inflammatory periodontal diseases (review of literature) // Institute of Dentistry. 2017. No. 4. P. 88–90.
5. Кузьмина Э.М., Кузьмина И.Н., Петрина Е.С. Стоматологическая заболеваемость населения России. Состояние тканей пародонта и слизистой оболочки рта / под ред. О.О. Янушевич. М.: МГМСУ. 2009. 236 с.
Kuzmina E.M., Kuzmina I.N., Petrina E.S. Stomatological incidence of the Russian population. Condition of periodontal tissues and oral mucosa / ed. by O.O. Yanushevich. Moscow: MSMSU. 2009. 236 p.
6. Лебедев Д.В. Микробиоценозы полости рта у больных генерализованным пародонтитом, способ диагностики и коррекции: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2011. 18 с.
Lebedev D.V. Microbiocenosis of the oral cavity in patients with generalized periodontitis, a method of diagnosis and correction: Thesis PhD. Moscow, 2011. 18 p.
7. Леус П.А. Профилактическая коммунальная стоматология. М.: Медицинская книга, 2008. 444 с.
Leus P.A. Preventive communal stomatology. Moscow: Meditsinskaya Kniga, 2008. 444 p.
8. Сгибнева В.А. Оценка распространенности и интенсивности заболеваний пародонта у взрослого населения города Барнаула // Здоровье и образование в XXI веке. 2016. Т. 18, № 5. С. 57–60.
Sgibneva V.A. The assessment prevalence and intensity of the periodontal diseases in the adult population on Barnaul // Health and Education Millenium. 2016. Vol. 18, No. 5. P. 57–60.
9. Стрельникова Н.В., Кольцов И.П., Антонова А.А. [и др.]. Способ культивирования бактерий рода *Leptotrichia* – резидентов микрофлоры полости рта: Патент РФ 2441908. 2012. Бюл. 4.
Strelnikova N.V., Koltsov I.P. Antonova A.A. [et al.]. Method of cultivation of bacteria of the genus *Leptotrichia* – residents of the oral cavity microflora // Patent of the Russian Federation 2441908. 2012. Bul. 4.
10. Стрельникова Н. В. Микробиологические свойства потенциальных патогенов человека рода *Leptotrichia*: дис. ... канд. мед. наук. Владивосток, 2010. 218 с.
Strelnikova N.V. Microbiological properties of potential pathogens of the genus *Leptotrichia*: Thesis PhD. Vladivostok, 2010. 218 p.
11. Changes in the incidence of periodontal pathogens during long-term monitoring and after application of antibacterial drugs // Folia Microbiol. 2009. Vol. 54, No. 5. P. 429–435.
12. Chappie I.L.C. Periodontal diagnosis and treatment where does the future lie? // Periodontology 2000. 2009. Vol. 51, No. 1. P. 9–24.
13. Higashi Y. Periodontal infection is associated with endothelial dysfunction in healthy subjects and hypertensive patients // Hypertension. 2008. Vol. 51, No. 2. P. 446–453.
14. Kriebel K., Hieke C., Müller-Hilke B. [et al.]. Oral biofilms from symbiotic to pathogenic interactions and associated disease – connection of periodontitis and rheumatic arthritis by peptidylarginine deiminase // Front Microbiol. 2018. doi: 10.3389/fmicb.2018.00053.
15. Timmerman M.F., van der Weijden G.A. Risk factors for periodontitis // Int. J. Dent. Hyg. 2016. Vol. 4, No. 1. P. 2–7.

Поступила в редакцию 15.05.2018.

EPIDEMIOLOGY OF NONSPECIFIC PERIODONTITIS CAUSED BY BACTERIA *LEPTOTRICHIA*, CHRONIC AND RECURRENT COURSE OF INFECTION

N.V. Strelnikova^{1,2}, A.A. Antonova¹, V.B. Turkyukov³, E.S. Shapovalenko¹

¹ Far Eastern State Medical University (35 Muravyeva-Amurskogo St. Khabarovsk 680000 Russian Federation), ² Regional Clinic Hospital No. 1 (9 Krasnodarskaya St. Khabarovsk 680000 Russian Federation), ³ Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 690002 Russian Federation)

Objective. The study objective is to assess the epidemiological significance of bacteria *Leptotrichia* in the development of purulent-septic infections of an oral cavity.

Methods. We carried out a retrospective epidemiological analysis of microbiocenosis of pathological periodontal pockets in non-specific periodontitis in 432 patients aged over 20 y.o.

Results. Microbiocenosis of pathological periodontal pockets in chronic and recurrent of medium and severe periodontitis more pronounced species diversity as compared to microbiocenosis in acute low periodontitis. Bacteria *Leptotrichia* were detected in all observations typically in association with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*, supporting the chronic recurrent process.

Conclusions. Analysis results of microbial status of periodontal pockets in patients with chronic periodontitis enable to recommend the use of empiric treatment of this pathology with antibacterial chemotherapeutic agents affecting non-spore-forming anaerobic bacteria.

Keywords: periodontitis, pathological periodontal pocket, *Leptotrichia*, microbiocenosis

УДК 615.37: 577.114:582.272:611

DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2018.4.75-79

Фукоидан из бурой водоросли *Fucus evanescens*: иммунофенотипические и морфологические изменения дендритных клеток – эффекторов врожденного иммунитета

И.Д. Макаренко¹, С.П. Ермакова², Н.К. Ахматова³, Т.И. Имбс², И.Б. Семенова³, М.Ю. Хотимченко⁴, Н.Н. Беседнова¹, М.А. Макаренков⁵, Т.Н. Звягинцева²

¹ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова (690087, г. Владивосток, ул. Сельская, 1), ² Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН (690022, г. Владивосток, пр-т 100-лет Владивостоку, 159), ³ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (105064, г. Москва, М. Казенный пер., 5а), ⁴ Дальневосточный федеральный университет (690091, г. Владивосток, ул. Суханова, 8), ⁵ Медицинское объединение ДВО РАН (690022 г. Владивосток, ул. Кирова, 95)

Исследовано действие фукоидана – сульфатированного полисахарида из морской бурой водоросли *Fucus evanescens* – на морфофункциональные свойства дендритных клеток, генерированных из костного мозга мышей линии BALB/c. Установлено, что фукоидан индуцирует созревание и морфологические изменения дендритных клеток. Результаты работы подтверждают, что фукоидан из *F. evanescens* активизирует систему врожденного иммунитета и может быть использован для защиты организма в условиях комплексной терапии инфекционных заболеваний.

Ключевые слова: фукоидан, дендритные клетки, иммунофенотип, морфология

Универсальной особенностью дендритных клеток (ДК) считается их высокая способность к распознаванию паттернов патогенных микроорганизмов различных таксономических групп и презентация антигена наивным Т-лимфоцитам, что обеспечивает развитие иммунного ответа при бактериальных, вирусных и онкологических заболеваниях [1, 4, 7]. Взаимодействие паттерн-распознающих рецепторов ДК, и прежде всего Toll-подобных рецепторов (Toll-like receptor – TLR), с лигандами приводит к развитию сигнального каскада, активации транскрипционных ядерных факторов и экспрессии разнообразных генов иммунного ответа. В настоящее время TLR служат мишенью для разработки новых адъювантов, поскольку их активация в процессе специфического связывания с лигандами играет ключевую роль в созревании и активации ДК (определяющих путь дифференцировки Т-лимфоцитов), развитии эффекторных механизмов врожденного и адаптивного иммунного ответа [1, 5, 9, 12].

Одним из актуальных направлений современной иммунологии можно назвать поиск эффективных биологически активных веществ – модификаторов функций врожденного иммунитета. Потенциальным источником для разработки фармакологических препаратов нового поколения с выраженным иммуномодулирующим действием считаются фукоиданы – гомо- и гетеросульфатированные полисахариды морских бурых водорослей, демонстрирующие выраженную противоопухолевую, иммуномодулирующую, антикоагулянтную, противовирусную, противовоспалительную и антибактериальную активности [2, 3, 6, 8, 10, 11, 13].

Фукоидан из бурой водоросли *Fucus evanescens* обладает полифункциональным спектром действия

Макаренко Илона Дамировна – д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник НИИ ЭМ; e-mail: ilona_m@mail.ru

и служит основой для разработки биологически активных веществ. Сочетание противовоспалительных, противоопухолевых и иммуномодулирующих свойств с антикоагулянтной и тромболитической активностью, а также гиполипидемические и гипогликемические свойства фукоидана из *F. evanescens* открывают перспективы его применения для коррекции различных патологических процессов. Клинические исследования показали, что включение полисахаридной композиции «Фуколам», основным компонентом которой служит фукоидан из *F. evanescens*, в базисную терапию больных облитерирующим атеросклерозом сосудов нижних конечностей с целью коррекции дисфункции иммунной системы способствовало нормализации липидного обмена, снижению коэффициента атерогенности, восстановлению баланса между перекисным окислением липидов и антиоксидантной защитой клеток [2, 3, 6]. С точки зрения доказательной медицины изучение механизма действия фукоидана из *F. evanescens* на ключевые эффекторы врожденного иммунитета открывает возможности для его дальнейших клинических испытаний и использования в комплексной терапии при онкологических и инфекционных заболеваниях.

Цель работы: анализ влияния фукоидана – сульфатированного полисахарида из бурой водоросли *F. evanescens* – на морфологические и иммунофенотипические свойства дендритных клеток костномозгового происхождения.

Материал и методы

Эксперимент проведен на 20 мышах-самцах линии BALB/c весом 16–18 г, полученных из питомника НЦ биомедицинских технологий «Андреевка» (Московская

область). Исследования выполнены с соблюдением правил и международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных работах.

Выделение и изучение химической структуры сульфатированного полисахарида проведены в ТИБОХ ДВО РАН. Фукоидан из *F. evanescens* представлял собой частично ацитилированный 1→3;1→4- α -L-фукан (интервал М.м. 40–60 кДа), сульфатированный в основном по положениям C₂- и в меньшей степени – по C₄-остаткам фукозы. Содержание сульфатов – 27%. Моносахаридный состав представлен Fuc:Gal:Xyl:Man в соотношении 77,9:9,5:8,4:4,2 [13].

ДК получали из клеток костного мозга. Костный мозг мышей гомогенизировали в среде RPMI-1640 (Sigma, США), трижды осаждали центрифугированием (250g×5 мин.) и переводили в обогащенную среду культивирования (10⁶ клеток/мл среды RPMI-1640 с добавлением 100 мкг/мл гентамицина сульфата и 10%-ной термоактивированной эмбриональной телячьей сыворотки), содержащую рекомбинантные факторы роста – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор и интерлейкин-4 (по 80 и 20 нг/мл; Biosource, США). Клетки культивировали при 37°C в 5%-ном углекислотном инкубаторе. На третьи сутки проводили повторную цитокиновую стимуляцию. Смену среды выполняли на шестые сутки, добавляя в опытные флаконы к популяции незрелых ДК индукторы созревания: фукоидан – 100 мкг/мл, и коммерческий фактор некроза опухоли- α (tumor necrosis factor α – TNF α) – 20 нг/мл (Biosource, США). Контролем стали незрелые ДК. Клетки с индукторами культивировали в течение 48 часов при 37°C в 5%-ном углекислотном инкубаторе.

Оценку иммунофенотипа ДК осуществляли методом проточной цитофлуориметрии на приборе Cytomix FC-500 (Beckman Coulter, США) с применением моноклональных антител (eBiosciences, США), меченных флуоресцин изотиоцианатом, к кластерам дифференцировки (cluster of differentiation – CD): CD34, CD38, CD83-PE, CD86-PE, CD80, CD11c, CD14-PE, а также к антигенам главного комплекса гистосовместимости класса II, TLR2 (CD282) и TLR4 (CD284-PE).

Для окраски актинового цитоскелета клетки с индукторами культивировали в плоскодонных планшетах с покровным стеклом. Через 48 часов после внесения индукторов отбирали среду из лунок, а клетки на стеклах фиксировали 3,7% раствором параформальдегида на натрий-фосфатном буфере (15 мин. при комнатной температуре). Окраску актинового цитоскелета проводили с использованием фаллоидина с флуоресцентным красителем (Alexa Fluor 594 phalloidin, Invitrogen) в разведении 1:150. Молекулы ДНК клеток окрашивали водным раствором красителя Hoechst 33342 (Sigma, США), разведенным до концентрации 1 мкг/мл. Клетки фотографировали при помощи микроскопа Nikon Eclipse Ti-U, оснащенного камерой Infinity 3 и флуоресцентными фильтрами UV-1A (для препаратов, окрашенных красителем Hoechst 33342, Sigma), B-2A (для наблюдения флуоресценции в зеленом диапазоне) и G-2A (для наблюдения флуоресценции в красном диапазоне).

Статистическую обработку данных проводили с помощью математического пакета Statistica 10. Вычисляли средние значения величин, определяли медиану (Me), нижний и верхний квартили (LQ–UQ). Достоверность разности анализировали при помощи *t*-критерия Стьюдента.

Результаты исследования

Сульфатированный полисахарид способствовал созреванию ДК, о чем свидетельствовали выраженные изменения клеток. Микроскопически незрелые ДК, генерированные из клеток-предшественников костного мозга мышей, на 6-е сутки культивирования имели округлую или неправильную форму, вакуолизированную цитоплазму и характеризовались способностью к выраженной пролиферации (рис., а). На 9-е сутки культивирования в популяции, как под действием TNF α , так и фукоидана, наблюдались выраженные морфологические изменения (рис., б, в). Появились крупные клетки неправильной звездчатой формы с обширной вакуолизированной цитоплазмой, эксцентрично расположенным неправильной формы ядром с многочисленными инвагинациями и большим

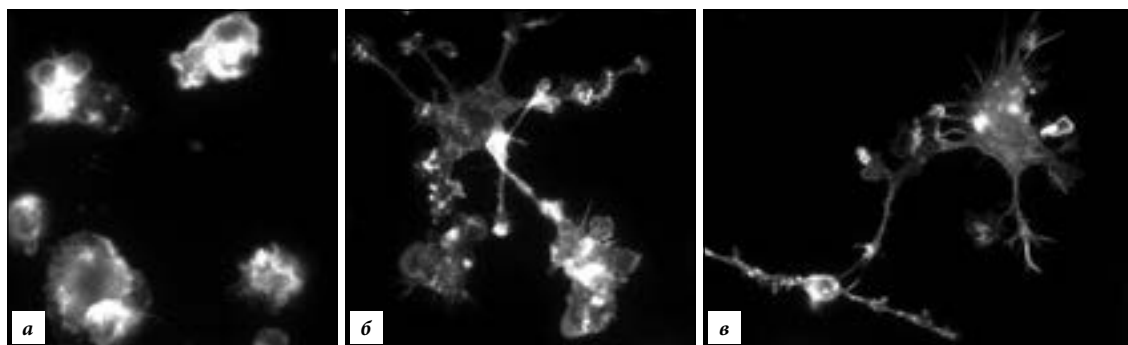


Рис. Микрофотографии ДК:

а – незрелые ДК на 6-е сутки культивирования в присутствии факторов роста; б – ДК на 9-е сутки культивирования в присутствии TNF α ; в – ДК на 9-е сутки культивирования в присутствии фукоидана из *F. evanescens*. Флуоресцентная микроскопия, $\times 400$.

количеством тонких цитоплазматических псевдоподий разнообразной длины и формы, что свидетельствовало о процессе созревания.

Процесс созревания ДК определялся по совокупности морфологических, иммунофенотипических и функциональных параметров. Незрелые ДК, генерированные из костного мозга мышей линии СВА в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора роста и интерлейкина-4, фенотипически обладали низким уровнем экспрессии ко-стимулирующих (CD80 и CD86) и антигенпредставляющих (главный комплекс гистосовместимости II класса) молекул и высоким уровнем CD34 – маркера незрелых клеток (табл.). Иммунофенотип и процесс созревания клеток оценивали по изменению уровня экспрессии дифференцировочных молекул на их поверхности: CD34, CD83, CD11c, CD38, CD80, CD86, CD14, молекул главного комплекса гистосовместимости класса II, TLR2 и TLR4.

Установлено, что, как под действием TNF α , так и сульфатированного полисахарида, происходило снижение экспрессии маркера незрелых клеток CD34 (в 7,9 и 4,5 раза, соответственно) и увеличение выработки маркера терминальной дифференцировки ДК – CD83 (в 8,8 и 7,1 раза, соответственно). Это подтверждал процесс снижения количества недифференцированных элементов. Следует отметить, что полученная популяция имела гетерогенный характер и содержала определенное количество клеток моноцитарной линии, о чем свидетельствовало наличие моноцитарно-макрофагального маркера CD14, экспрессия которого в процессе созревания снижалась под действием TNF α и под влиянием полисахаридной композиции (табл.).

Свойством ДК, отличающим их от других антигенпрезентирующих клеток, можно назвать способность представлять антигены и активировать наивные Т-клетки. Важную роль в процессе презентации антигена вместе с молекулами главного комплекса гистосовместимости класса II играют костимуляционные молекулы (CD80/CD86), усиливающие межклеточное взаимодействие при представлении антигена Т-лимфоцитам [1, 4, 7]. Анализ влияния TNF α и фукоидана из *F. evanescens* на активацию клеток показал увеличение экспрессии активационного маркера CD38 (в 2 и 1,5 раза, соответственно), адгезивных молекул CD11c (в 4,5 и 3 раза, соответственно). Выработка костимулирующих молекул CD80 и CD86 увеличилась в 4 и 2,5 раза и в 3,4 и 2,5 раза, соответственно. Также экспрессия антигенпредставляющих молекул главного комплекса гистосовместимости класса II возросла в 3,6 и 3,4 раза по сравнению с контролем, соответственно. Это свидетельствовало о способности созревших ДК представлять антиген наивным CD4⁺-клеткам (табл.).

Направление дифференцировки CD4⁺-клеток зависит прежде всего от Toll-подобных рецепторов, активация которых индуцирует экспрессию различных генов цитокинов [1, 4, 5]. Усиление экспрессии TLR2 и TLR4 (в 2,7 и 2,9 раза) на мембране ДК под действием биологически активной добавки «Фуколам»

Таблица

Характеристика фенотипа дендритных клеток

Маркеры и показатели		Доля позитивных клеток, %		
		Контроль	ДК+TNF α	ДК+фукоидан
CD34	Me	44,9	5,7 ^a	10,0 ^a
	LQ-UQ	37,7–46,0	5,6–9,4	9,6–10,9
CD83	Me	8,1	70,3 ^a	57,6 ^{a, 6}
	LQ-UQ	6,1–10,0	62,6–71,3	45,2–58,8
CD14	Me	54,2	32,4 ^a	40,1 ^a
	LQ-UQ	53,1–64,4	31,6–40,1	39,5–40,8
CD11c	Me	8,5	38,3 ^a	25,1 ^{a, 6}
	LQ-UQ	8,2–14,8	37,2–40,0	15,1–25,5
CD38	Me	18,1	38,2 ^a	26,8 ^a
	LQ-UQ	18,1–24,3	29,7–39,5	26,2–30,8
CD80	Me	12,0	48,4 ^a	30,6 ^{a, 6}
	LQ-UQ	11,6–19,2	47,5–57,5	24,0–31,9
CD86	Me	16,1	54,6 ^a	39,8 ^{a, 6}
	LQ-UQ	13,0–17,8	53,5–65,5	38,6–45,8
MHC II*	Me	21,1	76,9 ^a	72,0 ^a
	LQ-UQ	18,9–22,3	76,3–81,2	63,0–77,1
TLR2	Me	22,3	55,1 ^a	60,7 ^a
	LQ-UQ	21,5–23,4	43,0–55,7	50,4–61,4
TLR4	Me	6,6	25,5 ^a	19,3 ^{a, 6}
	LQ-UQ	5,2–13,0	27,4–33,3	17,5–23,1

* Major Histocompatibility Complex class II.

^a Разница с контролем (незрелые ДК) статистически значима.

⁶ Разница с группой «ДК+TNF α » статистически значима.

свидетельствовала в пользу того, что созревшие ДК способны к активации клеток-эффекторов врожденного иммунитета.

Обсуждение полученных данных

Изучение влияния иммунобиологически активных препаратов на морфофункциональные изменения ДК, позволяет оценить их действие на эффекторные механизмы врожденного иммунитета и создают научную основу для разработки лекарств нового поколения [3, 8, 11]. В настоящее время широко исследуется биологическое действие фукоиданов – сульфатированных полисахаридов морских бурых водорослей. Так, на основе фукоидана из бурой водоросли *F. evanescens*, обладающего широким спектром фармакологического действия, создана биологически активная добавка к пище [2, 3, 6, 12, 13].

По мнению ряда авторов, механизм действия фукоиданов связан с углеводспецифическим взаимодействием с мембранными рецепторами клеток, что усиливает экспрессию сигнальных мембранных молекул и инициируют развитие каскада биохимических реакций, приводящих к активации и функциональным изменениям иммунокомпетентных клеток, активации гемопоэза в красном костном мозге и пролиферативным процессам в первичных и вторичных органах иммуногенеза, активации Т- и В-лимфоцитов при эндотоксемии и т.д. Кроме того, за счет стимуляции цитотоксического действия натуральных киллеров

фукоиданы рассматриваются как адъюванты противоопухолевого иммунного ответа [3, 6, 11, 12].

Одним из важных критериев созревания и дифференцировки ДК служит наличие на их мембране маркера терминальной дифференцировки клеток – CD83 [1, 4, 7]. Усиление его экспрессии на фоне выраженного снижения экспрессии CD34 – маркера недифференцированных клеток – свидетельствуют об индуцирующем действии сульфатированного полисахарида из бурой водоросли, на процесс созревания. Это подтверждается типичными морфологическими изменениями клеток и появлением многочисленных цитоплазматических отростков, необходимых для контакта и представления антигена иммунокомпетентным клеткам.

Важное значение для активации и реализации эффекторных функций ДК имеют наследственно закодированные паттерн-распознающие рецепторы, адгезивные, костимулирующие и антигенпредставляющие молекулы, необходимые для распознавания, процессинга и презентации антигенов в комплексе с молекулами главного комплекса гистосовместимости CD4⁺-клетками. Анализ иммунофенотипа ДК показал, что сульфатированный полисахарид способствовал их дифференцировке. ДК, которые экспрессировали адгезивные (CD11c), активационные (CD38), костимулирующие (CD80/CD86) и антигенпредставляющие (главного комплекса гистосовместимости класса II) молекулы, способны к контактными взаимодействиями и презентации антигенов наивным Т-лимфоцитам (CD4⁺-клеткам).

Экспонирование на клеточной мембране моноцитарно/макрофагального маркера CD14 возможно связано с присутствием определенного количества клеток миело-моноцитарной линии, что говорит о гетерогенности полученной популяции. Можно предположить, что часть клеток не достигла завершающей фазы дифференцировки, о чем свидетельствовало наличие незначительного процента клеток, меченных CD34, – маркером незрелых ДК. Кроме того, не исключено, что сульфатированный полисахарид из бурой водоросли *F. evanescens*, способствует не только экспрессии TLR4 и костимулирующих молекул, но и CD14 на поверхности ДК. Тем не менее следует отметить, что снижение выработки CD14, как под действием классического индуктора (TNF α), так и под влиянием фукоидана на фоне выраженного увеличения экспрессии CD83, подтверждает дифференцировку клеток в ДК.

Направление дифференцировки CD4⁺-клеток во многом зависит от паттерн-распознающих рецепторов, участвующих в связывании экзогенных и эндогенных лигандов. Взаимодействие лиганда с конкретным TLR индуцирует генетически детерминированное развитие сигнального каскада через ряд адаптерных молекул и активацию транскрипционных ядерных факторов. Это запускает экспрессию различного спектра генов цитокинов или интерферониндуцибельных генов, оказывающих влияние на дифференцировку CD4⁺-клеток, что и определяет формирование и регуляцию иммунного ответа по клеточному или гуморальному типу. Кроме того, активация Toll-подобных рецепторов

индуцирует экспрессию костимулирующих молекул и терминальное созревание ДК [1, 4, 5, 9].

Для передачи сигналов TLR2 использует адаптерную молекулу белка первичного ответа миелоидной дифференцировки и опосредованный через эту молекулу и адаптерный белок, содержащий TIR домен, сигнальный путь, который запускает фосфорилирование киназы, ассоциированной с рецептором интерлейкина-1, и активацию транскрипционного ядерного фактора-кВ. Это индуцирует экспрессию генов провоспалительных цитокинов, тогда как TLR4 использует не только адаптерную молекулу белка первичного ответа миелоидной дифференцировки, но и адаптерную пару из белков, содержащих TIR домен, которая активирует интерферон-регулирующие факторы [5, 9, 12].

Увеличение экспрессии TLR2 и TLR4 на клеточной мембране под действием фукоидана позволяет говорить о дальнейшей активации ядерного фактора-кВ и продукции ДК интерферонов, провоспалительных и регуляторных цитокинов, способствующих активации эффекторных механизмов врожденного иммунитета и развитию адаптивного иммунного Т-хелперного ответа 1-го типа.

Таким образом, фукоидан – сульфатированный полисахарид из бурой водоросли *F. evanescens* – способствует активации врожденного иммунитета и может быть использован в качестве индуктора для получения из костномозговых предшественников гетерогенной популяции клеток, состоящей из пула зрелых ДК и клеток моноцитарно-макрофагального ряда, а так же как потенциальный адъювант для создания противоинойфекционной защиты организма.

Литература / References

1. Ахматова Н.К., Киселевский М.В. Врожденный иммунитет: противоопухолевый и противоинойфекционный. М.: Практическая медицина, 2008. 256 с.
Akhmatova N.R., Kiselevskiy M.V. Vrozhdennyy immunitet: protivopukholevyi i protivoinfeksionnyy. Moscow: Prakticheskaya meditsina, 2008. 256 p.
2. Имбс Т.Н., Звягинцева Т.Н., Ермакова С.П. «Фуколам» – первая в России биологически активная добавка на основе фукоидана // Вестник ДВО РАН. 2015. № 6. С. 145–149.
Imbs T.N., Zvyagintseva T.N., Yermakova S.P. "Fukolam" – the first food supplement based on fucoidan in Russia // Vestnik of the Far East Branch of the Russian Academy of Sciences. 2015. No. 6. P. 145–149.
3. Кузнецова Т.А., Запорожец Т.С., Персиянова Е.В. [и др.]. Перспективы использования сульфатированных полисахаридов бурых водорослей как вакцинных адъювантов // Биология моря. 2016. Т. 42, № 6. С. 399–406.
Kuznetsova T.A., Zaporozhets T.S., Persiyanova Ye.V. [et al.]. Prospects for the use of sulfated polysaccharides from brown seaweeds as vaccine adjuvants // Biologiya Morya (Russian Edition). 2016. Vol. 42, No. 6. P. 399–406.
4. Талаев В.Ю., Плеханова М.В., Матвейчев А.В. Экспериментальные модели, пригодные для оценки влияния компонентов новых разрабатываемых вакцин на дифференцировку дендритных клеток // МедиАль. 2014. Т. 12, № 2. С. 135–153.
Talayev V.YU., Plekhanova M.V., Matveichev A.V. In vitro models for investigation of vaccine component action upon dendritic cell maturation // MediAl. 2014. Vol. 12, No. 2. P. 135–153.
5. Тухватулин А.И., Логунов Д.Ю., Щербинин Д.Н. [и др.]. Toll-подобные рецепторы и их адаптерные молекулы // Биохимия. 2010. Т. 75, № 9. С. 1224–1243.

- Tukhvatulin A.I., Logunov D.Yu., Shcherbinin D.N. [et al.]. Toll like receptors and their accessory molecules // *Biochemistry (Moscow)*. 2010. Vol. 75, No. 9. P. 1224–1243.
6. Фукоиданы – сульфатированные полисахариды бурых водорослей. Структура. Ферментативная трансформация и биологические свойства / под ред. Н.Н. Беседновой и Т.Н. Звягинцевой. Владивосток: Дальнаука, 2014. 379 с. Fukoidany – sulfatirovannyye polisakharidy burykh vodorosley. Struktura. Fermentativnaya transformatsiya i biologicheskiye svoystva / N.N. Besednova and T.N. Zvyagintseva [eds]. Vladivostok: Dalnauka, 2014. 379 p.
 7. Dalod M., Chelbi R., Malissen B., Lawrence T. Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming // *EMBO J.* 2014. Vol. 33, No. 10. P. 1104–1116.
 8. Fitton J.H., Stringer D.N., Karpiniec S.S. Therapies from fucoidan: An update // *Mar. Drugs*. 2015. Vol. 13, No. 9. P. 5920–5946.
 9. Kawai T., Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors // *Nature Immunology*. 2010. Vol. 11. P. 373–384.
 10. Kim S.-Y., Joo H.-G. Evaluation of adjuvant effects of fucoidan for improving vaccine efficacy // *J. Vet. Sci.* 2015. Vol. 16, No. 2. P. 145–150.
 11. Lebedynskaya E.A., Makarenkova I.D., Lebedynskaya O.V. [et al.]. The effect of sulfated polysaccharides from brown seaweed *Laminaria japonica* on the morphology of lymphoid organs and functional characteristics of immunocompetent cells // *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B: Biomed Chemistry*. 2015. Vol. 9, No. 1. P. 86–94.
 12. Makarenkova I.D., Logunov D.Y., Tukhvatulin A.I. [et al.]. Sulfated polysaccharides of brown seaweeds are ligands of Toll-like receptors // *Biomedical Chemistry*. 2012. Vol. 6, No. 1. P. 75–80.
 13. Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Chizhov A.O. [et al.]. Water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. Distribution, structure, and their dependence on the developmental conditions // *J. Exp. Marine Biol. Ecol.* 2003. Vol. 294, No. 1. P. 1–13.

Поступила в редакцию 19.09.2018.

FUCOIDAN FROM THE TANG *FUCUS EVANESCENS*: IMMUNOPHENOTYPIC AND MORPHOLOGICAL CHANGES OF DENDRITIC CELLS – EFFECTORS OF INNATE IMMUNITY

I.D. Makarenkova¹, S.P. Ermakova², N.K. Akhmatova³, T.I. Imbs², I.B. Semenova³, M.Yu. Khotimchenko⁴, N.N. Besednova¹, M.A. Makarenkov⁵, T.N. Zvyagintseva²

¹ Somov Institute of Epidemiology and Microbiology (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russian Federation), ² G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry (159, 100 let Vladivostoku Ave. Vladivostok 690022 Russian Federation), ³ Mechnikov Scientific Research Institute of Vaccines and Serums (5a Maly Kazenny Lane, Moscow 105064 Russian Federation), ⁴ Far Eastern Federal University (8 Sukhanova St. Vladivostok 690091 Russian Federation), ⁵ Medical Association of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences (95 Kirova St. Vladivostok 690022 Russian Federation)

Objective. The study of the mechanism of action of sulfated polysaccharide from the tang *Fucus evanescens* on the morphological and immunophenotypic characteristics of dendritic cells (DC) – the key effectors of innate immunity – will enable to establish a rational spectrum for its use.

Methods. We investigated a partially acylated sulfated fucoidan from the tang *F. evanescens*. Immature DCs were obtained from bone marrow cells of BALB/c mice. Fucoidan (100 µg/ml) and commercial TNFα (20 ng/ml) were added as maturation inducers. Immunophenotypic cells were determined by flow cytometry using monoclonal antibodies.

Results. Fucoidan induced the maturation of DC, as evidenced by their immunophenotypic and morphological changes. A pool of mature cells capable of presenting the antigen to naive T-lymphocytes and activating the effector mechanisms of innate immunity was formed.

Conclusions. Thus, the sulfated polysaccharide from *F. evanescens*, which contributes to the activation of effector cells of innate immunity, can be used as a potential adjuvant to create an anti-infective defense of the body.

Keywords: fucoidan, dendritic cells, immunophenotype, morphology

Pacific Medical Journal, 2018, No. 4, p. 75–79.

УДК 616–022.6–053.2–085.33

DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2018.4.79–83

Применение препаратов интерферона и его индукторов в амбулаторной педиатрической практике

Т.Н. Суровенко, Л.Г. Присеко

Тихоокеанский государственный медицинский университет (690002, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Частота заболеваемости острыми респираторными вирусными инфекциями (ОРВИ) детей по-прежнему остается высокой. Применение существующего широкого спектра противовирусных лекарственных средств имеет определенные возрастные ограничения. Сохраняется потребность в универсальных препаратах, эффективно действующих на многие виды возбудителей и безопасных в детском возрасте. В клинических рекомендациях по терапии ОРВИ у детей допускается применение препаратов интерферона (ИФН) и его индукторов, но отмечается, что нет надежных доказательств эффективности их использования в отношении заболеваний этой группы. Тем не менее, как выяснилось в ходе исследования, препараты ИФН и его индукторов активно применяются в поликлинической практике у детей с раннего возраста в комплексной терапии ОРВИ, как противовирусные и иммуномодулирующие средства, что требует анализа их эффективности и безопасности.

Ключевые слова: дети, острые респираторные вирусные инфекции, лечение, интерфероны

Частота острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) у детей различных возрастов до сих пор остается высокой. По данным Росстата, среди

детей до 14 лет число зарегистрированных случаев острых инфекций верхних дыхательных путей возросло с 19 559,8 тыс. в 2014 г. до 21 352,2 тыс. в 2016 г. (или с 81 282 до 84 508,8 на 100 тыс. детей соответственно) [2]. Наибольшее количество заболевших

Суровенко Татьяна Николаевна – д-р мед. наук, профессор Института педиатрии ТГМУ; e-mail: tatiana.surovenko@gmail.com

наблюдается ежегодно с сентября по апрель – достаточно длительный период, чтобы причинить ощутимый экономический ущерб государству. Разнообразие вирусных агентов, их изменчивость и способность формировать устойчивость к лекарственным средствам заставляют искать все новые способы борьбы с ними. Применение существующего широкого спектра противовирусных лекарственных средств для детей имеет определенные возрастные ограничения, противопоказания и возможные побочные эффекты [9]. Сохраняется потребность в универсальных препаратах, эффективно действующих на многие виды возбудителей и безопасных для детей. В педиатрической практике в комплексном лечении ОРВИ активно используются интерферон (ИФН) и его индукторы, благодаря их противовирусному и иммуномодулирующему действию.

Интерфероны – белки, входящие в группу ключевых цитокинов, принимающие участие в различных биологических процессах, в том числе блокировании репликации вируса внутри клетки. Различают ИФН первого типа (альфа и бета), которым свойственно противовирусное и антипролиферативное действие, и второго типа (гамма), который демонстрирует противовоспалительный и иммуномодулирующий эффекты и участвует в реакциях гуморального иммунитета. Индукторы ИФН (интерферогены) стимулируют выработку организмом интерферона, причем действуя неизбирательно – на все три вида. ИФН и интерферогены могут быть природного и синтетического происхождения. К природным ИФН относятся интерферон человеческий лейкоцитарный, лейкоинтерферон, к синтетическим (рекомбинантным) – рекомбинантные интерфероны альфа и гамма в различных формах выпуска [3]. В настоящее время в клинике преимущественно используются препараты ИФН-альфа – «Гриппферон», «Виферон», «Генферон», «Назаферон» и др. К природным индукторам относятся «Кагоцел», «Ридостин» и др., к синтетическим – «Тилорон» («Амиксин», «Лавомакс»), «Меглюмина акридонацетат» («Циклоферон») и др.

Экзогенный ИФН циркулирует в организме недолго, что обуславливает необходимость его повторного введения. Экзогенный белок угнетает продукцию собственного ИФН по каналу отрицательной обратной связи. Такие ИФН вызывают в некоторых случаях побочные реакции, особенно при длительном или парентеральном введении, а также, обладая антигенностью, стимулируют выработку антител [5, 14]. Индукторы ИФН, напротив, модулируют пролонгированный синтез ИФН клетками иммунной системы. Они слабоаллергенны, не провоцируют выработку антител против ИФН. Однако действие индукторов наступает несколько отсроченно, поэтому в отношении острых заболеваний, по мнению многих исследователей, они будут менее эффективны, чем экзогенный ИФН [3, 12]. Препараты рекомбинантных интерферонов

и индукторы ИФН зарегистрированы и практикуются в России и некоторых странах СНГ, и их применение требует научного анализа как в плане эффективности, так и безопасности.

Иммунная система, в том числе интерфероновый статус, как известно, имеют возрастные особенности. От рождения до года их функции снижены. В зародыше, начиная с 10-й недели, циркулирует ранний ИФН, достигая пика своей концентрации к моменту рождения. Но, по сравнению с ИФН взрослого, он обладает низкими антивирусными и иммуномодулирующими способностями, кроме того, его содержание уменьшается уже в течение первого месяца жизни. С возрастом все системы, в том числе иммунная, адаптируются к условиям внешней среды, и способность выделять ИФН в требуемых количествах усиливается. У недоношенных и/или родившихся с низкой массой тела, и/или имеющих наследственные дефекты иммунной системы детей продукция интерфероногенеза по сравнению со здоровыми детьми снижена [5].

В клинических рекомендациях Министерства здравоохранения Российской Федерации по терапии ОРВИ у детей допускается применение ИФН и его индукторов, но отмечается, что нет надежных доказательств эффективности их использования в отношении данного заболевания. Среди отечественных ученых и практикующих врачей до сих пор нет единого мнения по этому вопросу. Таким образом, представляет интерес практическое состояние проблемы. Целью нашего исследования стал анализ применения препаратов интерферона и его индукторов в амбулаторной педиатрической практике.

Материал и методы

Выполнен ретроспективный анализ 344 амбулаторных карт детей, получавших лечение во Владивостокской детской поликлинике № 3 с 2012 по 2017 гг. Отбор проводился по наличию назначений препаратов ИФН и его индукторов, учитывались их формы, режим дозирования, наличие побочных реакций, диагноз. Данные разделены на три группы в соответствии с периодами детского возраста. В 1-й группе (117 человек) средний возраст исследуемых составил 2,4 года, во 2-й (131 человек) – 5,37 года, в третьей (96 человек) – 10,42 года. Также проведено анонимное анкетирование родителей этих детей с целью уточнения перечня назначавшихся препаратов ИФН и его индукторов.

Результаты исследования

Из группы интерферонов детям назначались «Интерферон лейкоцитарный человеческий», «Виферон», «Гриппферон», «Реаферон-ЕС Липинт», а из группы индукторов ИФН – «Амиксин», «Анаферон детский», «Генферон», «Кагоцел», «Полиоксидоний», «Циклоферон», «Цитовир-3», «Эргоферон». В 1-й группе

преимущественно применялись «Виферон», «Анаферон детский» и «Цитовир-3». Среди лекарственных форм преобладали свечи (табл.). Средняя продолжительность терапии составила 4,8 дня.

Во 2-й группе чаще использовались «Анаферон детский» и «Цитовир-3». Преимущественно назначались таблетированные формы. Средняя продолжительность терапии составила 5,1 дня. В 3-й группе дети в основном принимали «Циклоферон» и «Эргоферон» в таблетках (табл.). Средняя продолжительность их приема также равнялась 5,1 дня.

Частота назначений препаратов ИФН и его индукторов по заболеваниям: острое респираторное вирусное заболевание – 54 %, острый ринофарингит – 23 %, острая инфекция верхних дыхательных путей неуточненная – 11 %, острый фарингит – 6 %, острое респираторное заболевание – 5 %, синдром прорезывания зубов – 1 %. Таким образом, основное применение рассматриваемых препаратов в амбулаторной практике – лечение ОРВИ (94 %), так как все указанные выше заболевания (кроме неуточненной инфекции и синдрома прорезывания зубов) имеют вирусную природу. Индукторы ИФН назначались также с профилактической целью до и после вакцинации в течение 3–5 дней. Отметок об аллергических и аутоиммунных реакциях на эти препараты в ходе анализа амбулаторных карт найдено не было. В исследуемых группах препараты ИФН назначались в 43,3 %, а индукторы ИФН – в 56,7 % случаев.

Анкетируемые на вопрос о применяемых когда-либо препаратах ИФН и его индукторов отметили «Виферон» (26 %), «Анаферон» (14 %), «Цитовир» (12 %), «Эргоферон» (10 %), «Генферон» (9 %), «Гриппферон» (7 %), «Циклоферон» (7 %), «Кагоцел» (5 %), а также «Амиксин» (5 %) и «Полиоксидоний» (5 %).

Обсуждение полученных данных

Мнения медицинского сообщества о применении ИФН и его индукторов в педиатрической практике разнообразны и противоречивы. Если ВОЗ не рекомендует противовирусные препараты для детей из-за малочисленности научных свидетельств об их эффективности и безопасности при ОРВИ [15], то в нашей стране их применение допустимо [1]. Союз педиатров России считает, что назначение противовирусных препаратов с иммуотропным действием нецелесообразно, а доказательная база их противовирусной эффективности у детей, кроме «Осельтамивира» (с 1 года) и «Занамивира» (с 5 лет), остается крайне ограниченной [4]. Однако эти средства избирательно действуют на нейраминидазу вируса гриппа. В последние годы появились публикации об успешном использовании ИФН и его индукторов при других ОРВИ. Несмотря на разногласия в клинических рекомендациях и оценке результатов современных исследований эти препараты активно применяются в пра-

Таблица

Частота применения препаратов и лекарственных форм ИФН и его индукторов у детей с ОРВИ

Препарат и его формы	Частота применения, %			
	1-я группа	2-я группа	3-я группа	
ИФН*	1	–	–	
«Виферон»	47	8	3	
«Гриппферон»	–	1	–	
«Реаферон-ЕС Липинт»	1	–	7	
«Анаферон детский»	23	27	10	
«Эргоферон»	6	14	31	
«Циклоферон»	8	17	42	
«Цитовир-3»	12	20	–	
«Генферон Лайт»	2	3	–	
«Кагоцел»	–	10	7	
Формы	капли	1	–	7
	капсулы	–	3	–
	сироп	16	12	–
	свечи	56	13	–
	таблетки	27	72	93

* «Интерферон лейкоцитарный человеческий».

ктической педиатрии при лечении ОРВИ, что косвенно свидетельствует об их эффективности. Особенно активно используются противовирусные и иммуномодулирующие препараты у часто болеющих детей, иммунитет у которых не способен адекватно и в полной мере ответить на внедрение чужеродного агента. На сегодняшний день ИФН и интерфероногены для детей представлены в удобных и дозированных формах выпуска, что, несомненно, помогает врачу-педиатру подобрать лекарственное средство для скорейшего достижения положительного эффекта от терапии.

«ОРВИ – острая, в большинстве случаев, самоограничивающаяся инфекция респираторного тракта, проявляющаяся катаральным воспалением верхних дыхательных путей и протекающая с лихорадкой, насморком, чиханием, кашлем, болью в горле, нарушением общего состояния разной выраженности» [4]. При ней рекомендуется проводить симптоматическую терапию: адекватная гидратация, при рините – введение в нос физиологического раствора (2–3 раза в день), сосудосуживающих капель (не более 5 дней). При высокой температуре рекомендуют обтирание водой 25–30 °С, парацетамол или ибупрофен, при фарингите – теплое питье, а после 6 лет – леденцы или пастилки, содержащие антисептики [4].

Как правило, иммунная система здоровых детей справляется с вирусной атакой самостоятельно за 7–10, реже 14 дней, без каких-либо последствий. Но ослабленные, часто болеющие или имеющие хронические заболевания дети переносят ОРВИ тяжелее, у них чаще возникают осложнения. Назначение ИФН и его индукторов способствует повышению защитных сил организма и потенцированию противовирусного ответа и, следовательно, – профилактике осложнений.

На нашем материале в младшем возрасте (1-я группа) чаще использовались ректальные суппозитории и жидкие формы препаратов (сиропа, растворимые таблетки), что обеспечило лучшую биодоступность действующего вещества. В этом возрасте быстрее происходят всасывание и наступление фармакологического эффекта [11]. Среди назначений преобладал интерферон-альфа («Виферон»), который разрешен с первого месяца жизни, относительно безопасен (из противопоказаний в инструкции только индивидуальная непереносимость какого-либо компонента препарата). Он имеет дозированную форму выпуска в ректальных суппозиториях. Помимо ИФН препарат содержит антиоксидантные вещества (в суппозиториях – токоферол и аскорбиновая кислота), благодаря чему усиливаются иммуномодулирующий и противовирусный эффекты, а также оптимизируются регенеративные процессы. По данным многих отечественных исследований, «Виферон» помогает сократить лихорадочный период, облегчить течение болезни, достичь скорого разрешения вирусной инфекции, не вызывая антителигенеза в отношении действующего вещества и не оказывая токсического влияния на организм [13]. По результатам нашего исследования, «Виферон» применялся в 38 % случаев при ОРВИ, в основном в младшей возрастной группе.

Не менее часто использовался индуктор «Анаферон детский» (антитела к ИФН-гамма, аффинно очищенные в релиз-активной форме) в виде таблеток, которые можно растворить в кипяченой воде комнатной температуры, и давать детям уже жидкую форму, или «Анаферон детский, капли». Он потенцирует функциональную активность ИФН-гамма, который служит частью гуморального иммунитета. Производитель декларирует и его влияние на клеточный иммунитет – препарат повышает потенциал Т-хелперов, а также увеличивает цитотоксичность натуральных киллеров и запускает фагоцитоз. Как показано в клинических исследованиях, «Анаферон детский» обеспечивает адекватную продукцию ИФН всех трех типов в соответствии с вирусной нагрузкой в организме, при этом не перегружая иммунную систему [6, 14]. Имеется возможность применения препарата длительным профилактическим курсом, например, в период роста заболеваемости ОРВИ. Это лекарственное средство рекомендовано к применению с первого месяца жизни. «Эргоферон» – схожий с «Анафероном детским» препарат – также содержит антитела к ИФН-гамма в релиз-активной форме, но помимо этого в его состав входят антитела к CD4-клеткам и гистамину. Таким образом, он оказывает иммуномодулирующий, противовирусный и противовоспалительный эффекты, к тому же обладает антигистаминной активностью, что важно при наличии у ребенка хронических аллергических и бронхообструктивных заболеваний [8]. На нашем материале частота назначения «Анаферона детского» достигала 29 %, а «Эргоферона» – 13 % случаев, причем

«Эргоферон» назначался в основном детям старше десяти лет.

Доказанную в клинических исследованиях эффективность против ОРВИ и гриппа имеет препарат «Циклоферон» (N-метил-глюкаминавая соль) – он на ранних сроках инфицирования подавляет репликацию вирусного агента, повышает и поддерживает на нужном уровне концентрацию всех видов ИФН в организме, оказывает противовоспалительное действие. В особенности этот препарат эффективен у детей с низким интерфероновым статусом [7, 10]. Согласно полученным нами данным, «Циклоферон» применялся у 17 % детей.

Еще один индуктор ИФН, который часто используется в педиатрии – «Цитовир-3». В его состав входят три компонента: бендазол, глутамил-триптофан натрия и аскорбиновая кислота. Все они обеспечивают интерферогенный эффект, в частности в отношении ИФН-альфа, антиоксидантное действие, стимулируют фагоцитоз. На нашем материале препарат применялся у детей от двух до пяти лет в 18 % всех случаев.

По результатам анкетирования родителей детей в тройку лидеров по применению также вошли «Виферон», «Анаферон» и «Цитовир». Полученные данные свидетельствуют, что препараты индукторов ИФН в целом применяются чаще, чем сам ИФН.

Особое значение для амбулаторной педиатрии имеет форма выпуска лекарственных средств. Логично, что в 1-й возрастной группе преобладали свечи и жидкие формы для приема внутрь и интраназально. Во 2-й и 3-й группах преимущественно использовались таблетированные формы препаратов (72 и 93 %, соответственно). Такую же закономерность подтверждают другие исследователи [6, 9, 13, 14].

Имеются сведения о нежелательных эффектах при терапии ИФН и его индукторами, связанных с парентеральным системным введением данных препаратов. Проявление этих побочных реакций может отличаться в зависимости от вида ИФН, содержащихся в лекарственной форме вспомогательных веществ, способа получения действующего вещества, его первоначального источника и технологии производства лекарственного средства в целом, а также от состояния организма ребенка. В условиях поликлиники парентеральное введение препаратов на нашем материале не использовалось. Системное введение интерферонов в составе суппозитория преимущественно у детей раннего возраста не приводило к развитию явных нежелательных эффектов, так же как и местное применение. Требуются дальнейшие исследования в реальной клинической практике для сравнительной оценки эффективности и безопасности интерферонов и интерферогенов.

Таким образом, препараты интерферона и его индукторов широко применяются в амбулаторной педиатрической практике у детей с раннего возраста в комплексной терапии острых инфекционных

заболеваний, а также в качестве иммуномодуляторов в профилактических целях.

Литература / References

1. Приказ Минздрава РФ от 9 ноября 2012 г. № 798н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи детям при острых респираторных заболеваниях средней степени тяжести». The order of the Ministry of health of the Russian Federation of November 9, 2012 No. 798 n "About the approval of the standard of specialized medical care to children at acute respiratory diseases of moderate severity".
2. Здравоохранение в России 2017: статистический сборник. М.: Росстат, 2017. 170 с. Health in Russia 2017: Statistical compilation. Moscow: Rosstat, 2017. 170 p.
3. Баранаева Е.А. Острые респираторные вирусные инфекции у детей: клинические особенности, современные возможности профилактики и лечения // Международные обзоры: клиническая практика и здоровье. 2016. № 2. С. 6–15. Baranaeva E.A. Acute respiratory viral infections in children: clinical features, current potential of prevention and treatment // International Review: Clinical Practice and Health. 2016. No. 2. P. 6–15.
4. Баранов А.А., Намазова-Баранова Л.С., Лобзин Ю.В. [и др.]. Острая респираторная вирусная инфекция у детей: современные подходы к диагностике и лечению // Вопросы современной педиатрии. 2017. Т. 14, № 2. С.100–108. Baranov A.A., Namazova-Baranova L.S., Lobzin Yu.V. [et al.]. Acute respiratory viral infection in children: modern approaches to diagnosis and treatment // Current Pediatrics. 2017. Vol. 14, No. 2. P. 100–108.
5. Василевский И.В. Клинико-фармакологическая стратегия использования в педиатрической практике индукторов интерферона // Педиатрия. Восточная Европа. 2015. № 1. С. 88–100. Vasilevskiy I.V. Clinical and pharmacological strategy for the use of Interferon inducers in pediatric practice // Pediatrics. Eastern Europe. 2015. No. 1. P. 88–100.
6. Долинина Л.Ю. Преимущества применения эргоферона и анаферона в профилактике и лечении ОРВИ и гриппа // Архивъ внутренней медицины. 2015. № 1. С. 38–40. Dolinina L.Y. The advantages of using Ergoferon and Anaferon in the prevention and treatment of acute respiratory viral infections and influenza // Archive of Internal Medicine. 2015. No. 1. P. 38–40.
7. Думова С.В. Возможности использования циклоферона в педиатрии // Практика педиатра. 2017. № 4. С. 3–6. Dumova S. V. Possibilities of the use of Cycloferon in pediatrics // Practice of a Pediatrician. 2017. No. 4. P. 3–6.
8. Ершов Ф.И., Наровлянский А.Н. Использование индукторов интерферона при вирусных инфекциях // Вопросы вирусологии. 2015. № 2. С. 5–10. Ershov F.I., Narovlyanskiy A.N. Usage of Interferon inducers during viral infections // Problems of Virology. 2015. No. 2. P. 5–10.
9. Заплатников А.Л., Бурцева Е.И., Гирина А.А. [и др.]. Современные возможности и принципы рациональной терапии гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций у детей // Вопросы современной педиатрии. 2014. Т. 13, № 1. С. 129–133. Zaplatnikov A.L., Burtseva E.I., Girina A.A. [et al.]. Modern possibilities and principles of rational treatment of influenza and other acute respiratory viral infections in children // Current Pediatrics. 2014. Vol. 13, No. 1. P. 129–133.
10. Кирилина С.А. Стандарты диагностики и лечения гриппа и ОРВИ. Циклоферон – опыт клинического использования // Практика педиатра. 2018. № 1. С. 24–29. Kirilina S.A. Standards of diagnosis and treatment of influenza and acute respiratory viral infections. Cycloferon – experience of clinical use // Practice of a pediatrician. 2018. No. 1. P. 24–29.
11. Лозинский Е.Ю., Елисеева Е.В., Шмыкова И.И., Галанова Ю.Д. Особенности клинической фармакологии детского возраста // Тихоокеанской мед. журнал. 2005. № 3. С. 14–18. Lozinskiy E.U., Eliseeva E.V., Shmykova I.I., Galanova Yu.D. Features of clinical pharmacology in children // Pacific Medical Journal. 2005. No. 3. P. 14–18.
12. Новикова И.А. Современные аспекты клинического применения иммуномодуляторов // Медицинские новости. 2015. № 5. С. 23–26. Novikova I.A. The modern aspects of clinical application of immunomodulators // Medical News. 2015. No. 5. P. 23–26.
13. Чеботарева Т. А., Заплатников А. Л., Захарова И. Н. [и др.]. Современные возможности интерферонотерапии при гриппе и острых респираторных инфекциях у детей // Детские инфекции. 2013. № 2. С. 35–38. Chebotareva T.A., Zaplatnikov A.L., Zakharova I.N. [et al.]. Modern opportunities of Interferon therapy at influenza and acute respiratory viral infections // Children's Infections. 2013. No. 2. P. 35–38.
14. Шамшева О.В., Новосад Е.В. Анаферон – препарат выбора в педиатрической практике // Детские инфекции. 2013. № 3. С. 24–29. Shamsheva O.V., Novosad E.V. Anaferon – the drug of choice in pediatric practice // Children's infections. 2013. No. 3. P. 24–29.
15. World Health Organization. Cough and cold remedies for the treatment of acute respiratory infections in young children 2001. 39 p. URL: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/66856/WHO_FCH_CAH_01.02.pdf?sequence=1 (date of access: 26.03.2018).

Поступила в редакцию 07.06.2018.

THE USE OF INTERFERON AND ITS INDUCTORS IN OUTPATIENT PEDIATRIC PRACTICE

T.N. Surovenko, L.G. Priseko
Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 690002 Russian Federation)

Objective. Interferon and its inducers are extensively used in pediatrics in combined treatment of acute upper respiratory tract viral infection due to their antiviral and immunomodulatory effect. Among national scientists and clinicians there is still no consensus on their effectiveness. The concrete problem is of interest.

Methods. We conducted a retrospective analysis of 344 case records of children who treated in 2012–2017 in Outpatient Clinic No. 3 (Vladivostok). The selection was made by the prescription of interferon and its inducers.

Results. Recombinant alpha-interferon ('Veferon'), inductor 'Anaferon detskiy', and combined drug 'Citovir-3' were predominantly used in the group of young children. 'Anaferon detskiy' and 'Citovir-3' were predominantly used in the group of preteen children. Interferon inducers ('Cikloferon' and 'Ergoferon') were predominantly used in the third age group. Interferon inducers were also prescribed to children as a medical prevention before and after the immunization during 3–5 days. There was no report on allergic and autoimmune reactions to these drugs during the analysis of outpatient case records. In general, interferon drugs were prescribed in 43.3%, and interferon inducers – in 56.7% of cases.

Conclusion. Thus interferon drugs and it inducers are extensively used in pediatrics in children from young age in combined therapy of acute upper respiratory tract viral infection, and as immunomodulators for preventive purposes as well. Recombinant interferon drugs and interferon inducers are registered in Russia and some counties of CIS, and its use in pediatrics requires a further analysis both the effectiveness and the safety.

Keywords: children, acute upper respiratory tract viral infection, treatment, interferon

УДК 613.6:622.343(517.3)

DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2018.4.84-88

Гигиеническая оценка условий труда работников обогатительной фабрики горнообогатительного комбината «Эрдэнэт» (Монголия)

И.Ю. Тармаева¹, Одонцэцэг Браун^{1,2}, В.А. Панков³, М.В. Кулешова³

¹ Иркутский государственный медицинский университет (664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1),

² Фонд содействия развитию здравоохранения (Монголия, 211121, Улан-Батор, Сонгинохайрхан р-н, 1 микрор-н, 19-73),

³ Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований (665827, г. Ангарск, 12а микрорайон, 3)

Условия труда на обогатительной фабрике горно-обогатительного комбината «Эрдэнэт» (Монголия) по обогащению медно-молибденовых руд характеризуются наличием неблагоприятных факторов рабочей среды, основные из которых: производственный шум, общая вибрация и аэрозоли преимущественно фиброгенного действия. Уровни шума на основных рабочих местах превышают гигиенические нормативы, доходя до 10 дБА. Технологическое оборудование генерирует вибрации, превосходящие нормативы до 30 дБ. Концентрации пыли в воздухе рабочей зоны превышают предельно допустимые концентрации на рабочих местах в 1,1–12 раз. Содержание в воздухе вредных химических веществ (бензол, ксилол, диэтиловый эфир) превышают предельно допустимые концентрации в 2–3,6 раза. Рассматриваемая ситуация требует решения вопросов профилактики неблагоприятного воздействия факторов производственной среды на здоровье работающих.

Ключевые слова: медно-молибденовые руды, обогатительная фабрика, условия труда, гигиеническая оценка

Улучшение условий труда и сохранение здоровья работающих – одна из важных социально-экономических проблем любого государства. Предприятие «Эрдэнэт» (Монголия) представляет собой крупный горно-обогатительный комбинат (ГОК), ориентированный на добычу руды с месторождения медно-молибденовых руд Эрдэнэтийн-Овоо. Анализ данных литературы свидетельствует, что гигиеническая оценка условий труда и состояния здоровья работников ГОКа «Эрдэнэт», в том числе на обогатительной фабрике (ОФ), не проводилась. Вместе с тем, исследования, выполненные на подобных горнорудных предприятиях, показали, что сочетанное действие производственных факторов на организм работников может оказывать неблагоприятное влияние и приводить к развитию производственно-обусловленной и профессиональной патологии [1, 2, 5, 8]. При этом в процессе трудовой деятельности работники ОФ подвергаются воздействию таких производственных факторов, как высокие уровни шума и вибрации, запыленность воздушной среды и в ряде случаев – вредные вещества в воздухе рабочей зоны [3, 4, 6, 7].

Целью настоящей работы стал анализ особенностей условий труда работников ОФ ГОКа «Эрдэнэт».

Материал и методы

Гигиеническая оценка условий труда включала определение уровней вибрации, шума, параметров микроклимата, освещенности, запыленности и наличия вредных химических веществ в воздухе рабочей зоны в соответствии с нормативно-методическими документами, действующими на территории Монголии. Вся используемая аппаратура проходила метрологический контроль в установленные сроки.

Тармаева Инна Юрьевна – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой гигиены труда и гигиены питания ИГМУ; e-mail: t38_69@mail.ru

Для оценки элементного статуса был проведен многоэлементный анализ образцов волос, взятых у 12 мужчин трудоспособного возраста (средний возраст – 43,9 года). В группу сравнения вошли 28 лиц, не подвергавшихся воздействию вредных производственных факторов (средний возраст – 42,6 года). Анализ содержания химических элементов в биосубстратах проводили методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной аргоновой плазмой. Аналитические исследования выполнены в лаборатории ООО «Микронутриенты», аккредитованной в Федеральном агентстве по техническому регулированию и метрологии (аттестат аккредитации РОСС.RU.0001.22ПЯ.05) на приборе NexION 300D (Perkin Elmer, США).

В процессе анализа использовались методы описательной статистики с вычислением минимальных и максимальных величин, средних арифметических и их средних ошибок ($M \pm m$), медианы (Me) и квартилей ($Q_{25} - Q_{75}$).

Результаты исследования

ОФ ГОКа «Эрдэнэт» состоит из следующих отделений и участков: дробильно-транспортного, корпуса полусамозмельчения, измельчительно-флотационного, фильтровально-сушильного, реагентного, хвостового хозяйства, ремонта обогатительного оборудования и грузоподъемных механизмов, энерго-вентиляционного, внутризаводского транспорта и хозяйственной части. Основные профессиональные группы работников, занятых на обогащении руды: машинисты мельниц, машинисты конвейеров, дробильщики, флотаторщики, дозировщики, операторы, грохотовщики, крановщики, сушильщики.

Гигиеническая оценка уровней звука и звукового давления на основных рабочих местах ОФ показала,

Таблица 1 (начало)

Уровни факторов производственной среды на основных рабочих местах ОФ*

Рабочее место		Концентрация пыли, мг/м ³ **	Уровень шума, дБА	Уровень вибрации, дБ		
Корпус крупного дробления	Площадка питателя	мин.–макс.	3,8–24,0	85–88	62–64	
		средняя	11,8±0,5	87	64	
	Площадка дробилки	мин.–макс.	3,0–17,8	88–89	58–70	
		средняя	10,2±0,4	89	67	
	Площадка конвейера	мин.–макс.	3,1–13,0	85–92	62–71	
		средняя	8,0±0,3	90	68	
	Галерея	мин.–макс.	2,5–10,2	76–79	–	
		средняя	6,1±0,2	78	–	
	Ремонтная площадка	мин.–макс.	2,6–3,7	72–74	–	
		средняя	3,2±0,03	73	–	
	Корпус среднего и мелкого дробления	Площадка питателя	мин.–макс.	3,0–12,8	84–86	58–60
			средняя	8,4±0,3	85	60
Площадка дробилки		мин.–макс.	2,1–4,0	89–96	78–80	
		средняя	3,6±0,1	94	79	
Площадка конвейера		мин.–макс.	2,2–10,0	89–92	60–73	
		средняя	6,4±0,2	91	70	
Площадка грохота		мин.–макс.	2,1–4,4	88–96	54–56	
		средняя	3,2±0,1	93	55	
Операторская		мин.–макс.	1,0–1,2	64–66	47–50	
		средняя	1,1±0,01	65	49	
Корпус самоизмельчения	Площадка питателя	мин.–макс.	1,3–3,6	83–89	60–61	
		средняя	3,4±0,1	87	61	
	Площадка дробилки	мин.–макс.	3,4–15,8	85–89	68–74	
		средняя	6,2±0,3	87	72	
	Площадка конвейера	мин.–макс.	3,2–9,4	85–90	60–78	
		средняя	5,4±0,2	88	72	
	Площадка мельницы	мин.–макс.	2,0–3,2	83–98	55–57	
		средняя	2,8±0,04	95	56	
	Операторская	мин.–макс.	0,8–1,6	60–62	47–48	
		средняя	1,2±0,02	61	47	
	Кабина крана	мин.–макс.	3,2–4,0	80–89	68–70	
		средняя	3,6±0,02	87	69	

что уровни шума превышали гигиенические нормативы на площадках питателя, конвейеров, дробилок (корпус крупного дробления) на 2–5 дБА, площадках конвейеров, дробилок, грохотов (корпус среднего и мелкого дробления) – на 6–9 дБА, площадках питателя, конвейеров, дробилок, мельниц, в кабине крана (корпус самоизмельчения) – на 2–10 дБА, площадках фильтров (фильтровально-сушильное отделение) – на 6 дБА, площадках конвейеров (реагентное отделение) – на 1 дБА, площадках мельниц, дробилок, конвейеров, на рабочих местах флотаторщика и дозировщика (измельчительно-флотационное отделение) – на 1–3 дБА (табл. 1).

Технологическое оборудование ОФ служило источником общей вибрации. Гигиеническая оценка ее уровня на рабочих местах свидетельствовала о превышении нормативных параметров. Так, на основных рабочих местах в корпусе крупного дробления уровень

вибрации достигал 71 дБ, что на 21 дБ превышало предельно допустимый уровень (ПДУ). В корпусе среднего и мелкого дробления он превышал ПДУ на 30 дБ, в корпусе самоизмельчения – на 28 дБ. На рабочих местах в фильтровально-сушильном, реагентном, измельчительно-флотационном отделениях регистрировались уровни вибрации, превосходившие предельный на 24 дБ (табл. 1).

Содержание пыли в воздухе рабочей зоны превышало предельно допустимую концентрацию (ПДК) на всех рабочих местах дробильно-транспортного отделения ОФ (за исключением операторской) в 1,1–12 раз. На рабочих местах в корпусе самоизмельчения (площадка питателя, дробилки, конвейера, мельницы, кабина крана) превышение ПДК пыли составляло 1,6–7,9 раза, в фильтровально-сушильном отделении (площадка фильтров, сушильных барабанов, складе, кабина крана) – в 1,2–4,7 раза, в реагентном отделении

Таблица 1 (окончание)

Уровни факторов производственной среды на основных рабочих местах ОФ*

Рабочее место		Концентрация пыли, мг/м ³ **	Уровень шума, дБА	Уровень вибрации, дБ	
Фильтровально-сушильное отделение	Площадка фильтров	мин.–макс.	1,4–4,1	80–95	60–64
		средняя	3,2±0,1	91	61
	Площадка сушильных барабанов	мин.–макс.	1,9–9,4	78–82	70–74
		средняя	4,8±0,2	80	72
	Площадка электропечи	мин.–макс.	1,7–3,1	78–80	67–68
		средняя	2,8±0,03	79	68
	Операторская	мин.–макс.	1,1–1,8	62–68	49–50
		средняя	1,5±0,01	66	50
	Внутренний склад	мин.–макс.	1,7–2,9	70–74	55–57
		средняя	2,6±0,03	72	56
Склад отгрузки	мин.–макс.	1,2–2,4	73–77	–	
	средняя	2,2±0,03	75	–	
Кабина крана	мин.–макс.	1,4–4,2	78–81	66–68	
	средняя	3,6±0,1	80	67	
Реагентное отделение	Склад известки***	мин.–макс.	4,9–12,9	68–72	–
		средняя	8,8±0,2	70	–
	Растворный узел	мин.–макс.	2,4–9,6	71–82	–
		средняя	6,3±0,2	79	–
	Площадка мельницы	мин.–макс.	3,2–6,8	88–94	62–74
		средняя	5,4±0,1	92	66
	Площадка конвейера	мин.–макс.	4,2–8,2	80–88	66–68
		средняя	6,0±0,1	86	67
	Операторская	мин.–макс.	2,0–2,2	59–60	45–46
		средняя	2,1±0,01	60	46
Кабина крана	мин.–макс.	2,9–4,6	78–84	68–70	
	средняя	3,8±0,04	80	69	
Измельчительно-флотационное отделение	Площадка дробилки	мин.–макс.	1,1–2,0	85–90	39–40
		средняя	1,8±0,02	88	40
	Площадка мельницы	мин.–макс.	1,3–1,7	85–93	56–58
		средняя	1,5±0,01	89	57
	Площадка конвейера	мин.–макс.	0,9–6,7	85–89	39–54
		средняя	3,2±0,1	88	51
	Раб. место флотаторщика	мин.–макс.	0,9–1,2	78–93	72–74
		средняя	1,0±0,01	86	73
Раб. место дозировщика	мин.–макс.	0,7–1,7	85–93	45–46	
	средняя	1,4±0,02	87	45	

* Предельно допустимая концентрация пыли – 2 мг/м³, предельно допустимый уровень шума – 85 дБА, предельно допустимый уровень вибрации – 50 дБ.

** Для показателя «концентрация пыли» средняя арифметическая приведена с ошибкой средней (M±m).

*** Предельно допустимая концентрация известковой пыли – 6 мг/м³.

(растворный узел, площадка мельницы, конвейера, операторская, кабина крана) – в 1,1–6,4 раза, в измельчительно-флотационном отделении на площадке конвейера – в 3,3 раза (табл. 1).

Концентрации оксида азота и хлористого водорода в воздушной среде на площадках фильтров фильтровально-сушильного отделения не превосходили ПДК. На рабочем месте флотаторщика измельчительно-флотационного отделения в воздухе присутствовали оксид углерода, сернистый ангидрид, керосин, уровни которых находились в пределах допустимых

концентраций, а также бензол, ксилол и диэтиловый эфир, концентрация которых значительно превышала ПДК. На рабочем месте дозировщика измельчительно-флотационного отделения отмечалось превышение допустимых уровней сернистого ангидрида и бензола в 2 и 3,6 раза, соответственно (табл. 2).

Оценка параметров микроклимата на рабочих местах ОФ показала, что температура, относительная влажность и скорость движения воздуха в основном соответствовали гигиеническим нормативам как в теплый, так и в холодный периоды года. Параметры

Таблица 2

Загрязненность воздуха рабочей зоны вредными химическими веществами

Рабочее место		Концентрация химического вещества, мг/м ^{3*}								
		Оксид азота	Хлористый водород	Оксид углерода	Сернистый ангидрид	Керосин	Непредельные углеводороды	Бензол	Ксилол	Диэтиловый эфир
Фильтровально-сушильное отделение										
Площадка фильтров	мин.-макс.	2,0–2,4	2,2–2,4	–	–	–	–	–	–	–
	средняя	2,1±0,01	2,3±0,01	–	–	–	–	–	–	–
Измельчительно-флотационное отделение										
Раб. место флотаторщика	мин.-макс.	–	–	5,8–6,2	5,0–10,0	45,0–50,0	–	20,0–75,0	7,2–70,0	400–2000
	средняя	–	–	6,1±0,01	8,3±0,1	47,0±0,1	–	35,0±1,5	32,0±1,8	860,0±44,9
Раб. место дозировщика	мин.-макс.	–	–	–	5,0–20,0	43,0–50,0	44,0–50,0	20,0–80,0	–	–
	средняя	–	–	–	12,5±0,4	46,0±0,2	48,0±0,2	54,0±1,7	–	–

* ПДК: оксид азота – 5 мг/м³, хлористый водород – 5 мг/м³, оксид углерода – 20 мг/м³, сернистый ангидрид – 10 мг/м³, керосин – 300 мг/м³, непредельные углеводороды – 150 мг/м³, бензол – 15 мг/м³, ксилол – 150 мг/м³, диэтиловый эфир – 300 мг/м³.

Таблица 3

Содержание химических элементов в волосах работников ОФ и лиц группы сравнения

Элемент	Содержание в биосубстрате, мг/кг			
	Работники ОФ		Группа сравнения	
	Me	Q ₂₅ –Q ₇₅	Me	Q ₂₅ –Q ₇₅
Al	4,64	3,14–5,08	7,06	5,15–19,71
Ca	351	306–459	605	486–872
Cd*	0,01	0,01–0,02	0,02	0,01–0,05
Co	0,006	0,006–0,01	0,02	0,01–0,05
Cr	0,14	0,11–0,19	0,26	0,15–0,43
Cu*	12,6	12,4–12,7	14,5	12,4–22,1
Fe	11,1	10,3–14,0	22,0	14,1–50,8
Hg*	0,12	0,10–0,37	0,12	0,05–0,24
I	0,05	0,02–0,12	0,15	0,1–0,25
Mo	0,35	0,21–0,40	0,57	0,14–1,33
Pb*	0,57	0,42–0,77	0,65	0,32–1,46
Se	0,29	0,25–0,37	0,34	0,30–0,35
V	0,01	0,01–0,01	0,03	0,02–0,06

* Разница в содержании между группами сравнения кадмия, меди, ртути и свинца статистически не значима (p<0,05).

освещенности также не выходили за пределы референсных значений.

В связи с тем, что ГОК «Эрдэнэт» ориентирован на добычу медно-молибденовых руд, представляло интерес изучение элементного статуса работников ОФ. Результаты исследования показали, что элементный состав волос работников основных профессий ОФ и лиц группы сравнения существенно различался. В первую очередь это касалось эссенциальных микроэлементов. Так, уровень кобальта в волосах работников ОФ был выше нормы в 3,3 раза, хрома – в 1,9 раза, железа – в 2 раза, йода – в 3 раза, селена – в 1,2 раза и молибдена – в 1,6 раза. В то же время уровни большинства макроэлементов у работников ОФ и лиц группы сравнения достоверно не различались за исключением кальция, содержание которого

в биосубстрате у работников ОФ в 1,7 раза превышало норму. Следует особо подчеркнуть отсутствие значимых различий между группами по содержанию основных токсичных тяжелых металлов – свинца, кадмия и ртути. Что же касалось других токсичных и условно токсичных химических элементов, то у работников ОФ регистрировалось более высокое содержание в волосах алюминия и ванадия – в 1,5 и 3 раза, соответственно (табл. 3).

Обсуждение полученных данных

Анализ результатов гигиенических исследований показал, что на различных этапах подготовки руды к обогащению, работники ОФ ГОКа «Эрдэнэт» подвергаются комплексному воздействию факторов производственной среды: шума, технологической вибрации, пыли, уровни которых значительно превышают гигиенические нормативы. Таким образом, условия труда на данном предприятии по степени вредности и опасности можно отнести к категории вредных. Следует отметить, что в ряде отечественных работ уже было показано, что на рабочих местах лиц, занятых обогащением руды, наблюдаются не только высокие уровни шума, общей вибрации и запыленности воздуха, но также и неблагоприятные микроклиматические условия и воздействие инфразвука, а также малых доз ионизирующей радиации [1, 5]. Имеющиеся отличия в уровнях влияния на организм упомянутых факторов вероятнее всего связаны с разными технологическими условиями производства на ОФ ГОКа «Эрдэнэт» и горно-обогатительных предприятиях, расположенных на территории Российской Федерации. Данных по рассматриваемой проблеме за последние годы в доступной зарубежной научной литературе нами не обнаружено.

Вредные условия труда обуславливают риск развития острых и обострения хронических общих заболеваний, возникновение профессиональной патологии.

Показано, что у работающих в таких условиях наблюдаются высокие уровни заболеваемости с временной утратой трудоспособности по болевым лицам, случаям и дням нетрудоспособности. Причем в структуре этих заболеваний более 50 % приходится на патологию органов дыхания. Среди этого контингента работников также распространены болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани, органов пищеварения и системы кровообращения [1, 7].

В наших исследованиях показано, что элементные профили работников обогатительной фабрики и лиц, не подвергающихся воздействию вредных производственных факторов, отличаются. Так, уровни кобальта, хрома, железа, йода, селена, молибдена и кальция в волосах были значительно выше у работников обогатительной фабрики, чем у лиц группы сравнения. Особо следует отметить отсутствие значимых различий по накоплению основных токсичных тяжелых металлов – свинца, кадмия и ртути. Указанное можно рассматривать как свидетельство того, что различия в содержании эссенциальных элементов в образцах волос обусловлены не их вытеснением из организма в результате антагонистического влияния со стороны экотоксикантов, а более высоким уровнем в организме именно самих эссенциальных элементов.

Выводы

1. Условия труда на предприятии по обогащению медно-молибденовых руд характеризуются наличием неблагоприятных факторов рабочей среды, основные из которых: производственный шум, общая вибрация и аэрозоли преимущественно фиброгенного действия.
2. Особенности условий труда работников основных профессий ОФ медно-молибденового ГОКа обуславливают высокое содержание в организме кобальта, хрома, железа, йода, селена, молибдена и кальция.

Литература / References

1. Боранова Н.А., Рушкевич О.П., Луценко Л.А. Профессиональное здоровье работников фабрик по обогащению железистых кварцитов и меры профилактики // Медицина труда и промышленная экология. 2009. № 8. С. 34–37.
Boranova N.A., Roushkevitch O.P., Loutsenko L.A. Occupational health in factory workers engaged into iron quartzite enrichment, prophylactic measures // Occupational Health and Industrial Ecology. 2009. No. 8. P. 34–37.
2. Каримова Л.К., Гайнуллина М.К., Гребенева О.В. [и др.]. О состоянии условий труда работниц горно-обогатительной фабрики // Гигиена труда и медицинская экология. 2017. № 1. С. 22–29.
Karimova L.K., Gaynullina M.K., Grebeneva O.V. [et al.]. On the state of working conditions for female workers of the ore dressing and processing plant // Hygiene of Labor and Medical Ecology. 2017. No. 1. P. 22–29.
3. Квагинидзе В.С., Корецкая Н.А. Безопасность труда на обогатительных фабриках Севера. М.: Горная книга, 2005. 328 с.
Kvaginidze V.S., Koretskaya N.A. Safety at the ore dressing factories of the North. Moscow: Gornaya Kniga, 2005. 328 p.
4. Семенова И.Н., Рафикова Ю.С. Гигиеническая характеристика условий труда рабочих Сибайского филиала Учалинского горно-обогатительного комбината // Фундаментальные исследования. 2011. № 9. С. 509–512.
Semenova I.N., Rafikova Y.S. Hygienic characteristic of conditions of Sibay branch of Uchaly ore-dressing plant // Fundamental Research. 2011. No. 9. P. 509–512.
5. Чашин В.П., Аскарова З.Ф. Априорный профессиональный риск для здоровья работников горно-обогатительного предприятия // Медицина труда и промышленная экология. 2008. № 9. С. 18–22.
Tchashin V.P., Askarova Z.F. A priori occupational health risk for workers of ore mining and processing enterprise // Occupational Health and Industrial Ecology. 2008. No. 9. P. 18–22.
6. Чеботарев А.Г., Наумова А.П. Условия труда и их социально-гигиенический мониторинг на предприятиях горнорудного комплекса // Медицина труда и промышленная экология. 2002. № 6. С. 17–21.
Chebotarev A.G., Naumova A.P. Working conditions and their socio-hygienic monitoring at mining enterprises // Occupational Health and Industrial Ecology. 2002. No. 6. P. 17–21.
7. Чеботарев А.Г., Головкова Н.П. Гигиенические проблемы оздоровления условий труда при обогащении полезных ископаемых // Горная промышленность. 2013. № 3. С. 104–110.
Chebotarev A.G., Golovkova N.P. Hygienic problems of improving working conditions in the enrichment of minerals // Mining. 2013. No. 3. P. 104–110.
8. Bialy W. Environmental working conditions versus occupational diseases in the hard coal mining branch // Scientific Journals. 2012. No. 31. P. 37–44.

Поступила в редакцию 03.09.2018.

SANITARY AUDIT OF WORKING CONDITIONS IN THE CONCENTRATING MILL OF ORE MINING AND PROCESSING ENTERPRISE ERDENET (MONGOLIA)

I.Yu. Tarmaeva¹, Odontsetseg Braun^{1,2}, V.A. Pankov³, M.V. Kuleshova³

¹ Irkutsk State Medical University (1 Krasnogo Vosstaniya St. Irkutsk 664003 Russian Federation), ² Promotion Fund of Healthcare (19-73, 1st Neighborhood, Songinokhayrkhon district, Ulan-Bator 211121 Mongolia), ³ East Siberian Institute of Medical and Ecological Researches (3, 12a Neighborhood, Angarsk 665827 Russian Federation)

Objective. Working conditions in the concentrating mill of ore mining and processing enterprise were analyzed.

Methods. We measured the levels of vibration, noise, microclimate parameters, lightness, dustiness and the level of harmful chemicals in the air of the work area in accordance with regulatory and methodological documents of Mongolia. All used equipment underwent metrological control in a timely manner. To assess the elemental status of workers, a multi-element analysis of hair samples by mass spectrometry was carried out.

Results. The noise level at the main work stations exceeded the hygienic standards by 10 dBA. Technological equipment generated vibrations, the intensity of which also exceeded hygienic standards. The concentration of dust in the air of the working area exceeded the maximum allowable by 1.1–12. The concentrations of harmful chemicals (benzene, xylene, diethyl ether) were by 2–3.6 higher than normal.

Conclusions. At various stages of preparation of ore for enrichment, workers of the concentrating mill are exposed to a complex influence of factors of the production environment, the level of which considerably exceeds hygienic standards. The main unfavorable factors of the working environment can be called production noise, general vibration and the impact of fibrogenic aerosols. Thus, working conditions at the ore mining and processing enterprise Erdenet can be classified as harmful. At the workplaces of persons engaged in ore processing, there are also unfavorable microclimatic conditions and the impact of infrasound, as well as low doses of ionizing radiation.

Keywords: copper-molybdenum ores, concentrating mill, working conditions, sanitary audit

УДК 616.98:579.862.1–084:614.47]–078–036.22

DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2018.4.89–90

Серологический мониторинг при оценке эффективности вакцинопрофилактики пневмококковой инфекции у детей в организованных коллективах

Д.С. Колесник¹, А.Е. Гончаров^{1, 2}, В.В. Колоджиева¹, Л.Ю. Нилова¹, В.В. Нечаев¹, Е.А. Оришак¹¹ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (191015, г. Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41), ² Институт экспериментальной медицины (197376, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12)

Оценена серотиповая структура популяции *Streptococcus pneumoniae* на фоне внедрения массовой вакцинопрофилактики пневмококковой инфекции. Показано снижение распространенности серотипов возбудителя под действием 13-валентной конъюгированной пневмококковой вакцины среди носителей в детских коллективах по сравнению с показателем, полученным в той же группе населения в довакцинальный период. Очевидна необходимость в продолжении серологического мониторинга как элемента оценки эффективности вакцинации.

Ключевые слова: *Streptococcus pneumoniae*, вакцинопрофилактика, серологический мониторинг

В настоящее время в Российской Федерации и ряде других стран при проведении массовой иммунизации активно используются конъюгированные пневмококковые вакцины, к преимуществам которых, по сравнению с полисахаридными, относят способность создавать иммунитет на слизистых оболочках, тем самым снижая частоту носительства вакцинных штаммов [7]. Тем не менее эффективность конъюгированных вакцин в разных странах различается [6]. В России проведено несколько исследований, направленных на оценку эффективности вакцинации конъюгированными пневмококковыми вакцинами [3, 4], однако данные работы носят характер клинических испытаний или экспериментальных эпидемиологических исследований. В то же время для заключения об эффективности вакцин важны данные эпидемиологического надзора, включающие оценку динамики заболеваемости и носительства до и после применения [1].

Цель исследования – установление эпидемиологических особенностей носительства *Streptococcus pneumoniae* различных серотипов в организованных детских коллективах в период вакцинопрофилактики.

Материал и методы

На назальное носительство *S. pneumoniae* было обследовано 1574 ребенка в возрасте от 2 до 7 лет, посещавших детские дошкольные учреждения Санкт-Петербурга. Посевы материала проводились на кровяной агар на основе колумбийского агара (НИЦФ, РФ) с добавлением 5 % дефибрированной крови и сыворотки крупного рогатого скота. Идентификация *S. pneumoniae* осуществлялась на основе общепринятых микробиологических методов, подтверждение видовой идентификации выполнялось путем амплификации

Гончаров Артемий Евгеньевич – д-р мед. наук, доцент кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии СЗГМУ; e-mail: phage1@yandex.ru

гена аутолизина (*lytA*) [9]. Определение серологических типов выделенных штаммов осуществлялось с помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции [8]. Всего серотипированию было подвергнуто 111 изолятов. Дополнительно был проведен анализ заболеваемости детского населения Санкт-Петербурга острыми отитами и внебольничными пневмониями в 2013–2016 гг. по данным форм статистической отчетности № 12 «Сведения о числе заболеваний, зарегистрированных у пациентов, проживающих в районе обслуживания медицинской организации».

При статистическом анализе использовались методы описательной статистики. Для оценки значимости различий применяли *t*-критерий Стьюдента с расчетом 95 %-ного доверительного интервала (ДИ).

Результаты исследования

Частота носительства *S. pneumoniae* на нашем материале оказалась невысокой – 8,53 на 100 обследованных (95 % ДИ: 7,88–11,38). В структуре микробиологического пейзажа преобладали серотипы 19F и 23F, частота регистрации коротких составила 18 и 7 %, соответственно. Доля серотипов штаммов *S. pneumoniae*, охватываемых действием 13-валентной вакцины, равнялась 36,03 на 100 изолятов (95 % ДИ: 27,1–44,96), что достоверно ниже соответствующего показателя (65,4 на 100 изолятов; 95 % ДИ: 56,68–73,44), определенного в аналогичном по дизайну исследовании, проведенном в Санкт-Петербурге в 2010–2013 гг. [2]. Вместе с тем, оставалось неясным, можно ли считать это снижение результатом вакцинопрофилактики, поскольку уровень охвата профилактическими прививками в изучаемой популяции был достаточно низким (11,4 %). Так, динамика заболеваемости острыми отитами и внебольничными пневмониями, в развитии которых пневмококки – наиболее значимые этиологические факторы, не обнаруживала тенденции к снижению (рис.).

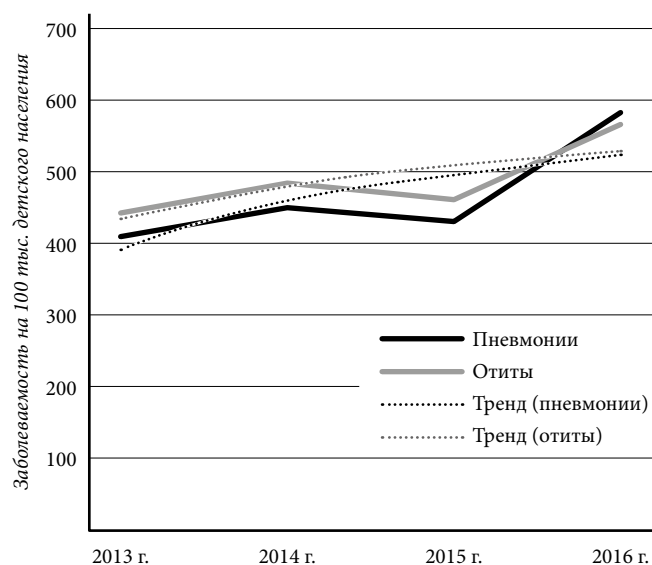


Рис. Заболеваемость детей до 14 лет острыми отитами и пневмониями в г. Санкт-Петербурге в 2013–2016 гг.

Обсуждение полученных данных

Смена доминирующих серотипов *S. pneumoniae*, как следствие проводимых программ массовой иммунопрофилактики пневмококковой инфекции, считается глобальной проблемой, требующей постоянного мониторинга и стимулирующей разработку новых вакцин [5]. Несмотря на сравнительно небольшой период наблюдения за изменениями серотиповой структуры пневмококков, происходящими в Санкт-Петербурге на фоне внедрения вакцинации конъюгированными пневмококковыми вакцинами, очевидно, что в организованных детских коллективах сохраняется возможность для активной циркуляции пневмококков невакцированных серотипов, что может обуславливать отсутствие снижения заболеваемости острым гнойным отитом и внебольничными пневмониями.

Заключение

Широкое распространение пневмококков серотипов, неохватываемых действием 13-валентной пневмококковой вакцины, с одной стороны, свидетельствует о необходимости постоянного мониторинга серотиповой структуры популяции возбудителя в ходе программ массовой иммунизации, а с другой – позволяет поставить вопрос о важности расширения антигенного репертуара применяемых вакцин.

Литература / References

1. Брико Н.И., Лобзин Ю.В., Баранов А.А. [и др.]. Оценка эффективности вакцинации: основные подходы и спорные вопросы // Педиатрическая фармакология. 2014. Т. 11, № 4. С. 8–15. Briko N.I., Lobzin Yu.V., Baranov A.A. [et al.]. Evaluation of the effectiveness of vaccination: the main approaches and issues // Pediatric pharmacology. 2014. Vol. 11, No. 4. P. 8–15.
2. Лобзин Ю.В., Сидоренко С.В., Харит С.М. [и др.]. Серотипы *Streptococcus pneumoniae*, вызывающих ведущие нозологические формы пневмококковых инфекций // Журнал инфектологии. 2013. Т. 5, № 4. С. 36–42. Lobzin Yu.V., Sidorenko S.V., Kharit S.M. [et al.]. Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* causing major pneumococcal infections // Journal Infectology. 2013. T. 5, No. 4. P. 36–42.

3. Перова А.Л., Рудакова А.В., Харит С.М. Эффективность конъюгированной пневмококковой вакцины для профилактики пневмококковых инфекций // Журнал инфектологии. 2014. Т. 6, № 2. С. 43–47. Perova A.L., Rudakova A.V., Harit S.M. Efficacy of conjugate vaccines in pneumococcal infection prevention // Journal Infectology. 2014. T. 6, No. 2. P. 43–47.
4. Федосеенко М.В., Новикова Д.А., Ткаченко Н.Е. [и др.]. Опыт применения и оценка безопасности 13-валентной пневмококковой конъюгированной вакцины у детей младше 5 лет // Педиатрическая фармакология. 2014. Т. 11, № 5. С. 59–64. Fedoseenko M.V., Novikova D.A., Tkachenko N.E. [et al.]. Experience of application and safety assessment of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in under-5 children // Pediatric pharmacology. 2014. Vol. 11, No. 5. P. 59–64.
5. Daniels C.C., Rogers P.D., Shelton C.M. A review of pneumococcal vaccines: Current polysaccharide vaccine recommendations and future protein antigens // J. Pediatr. Pharmacol. Ther. 2016. Vol. 21, No. 1. P. 27–35.
6. Hausdorff WP, Siber G., Paradiso P.R. Geographical differences in invasive pneumococcal disease rates and serotype frequency in young children // Lancet. 2001. Vol. 357, No. 9260. P. 950–951.
7. Nukka A., Ahman H., Yaich M. [et al.]. Serum and salivary anti-antibodies in infants and children immunized with heptavalent pneumococcal conjugate vaccine // Pediatric Infectious Diseases Journal. 2001. Vol. 20. P. 25–33.
8. Pimenta F.C., Gertz Jr. R.E., Roundtree A. [et al.]. Rarely occurring 19A-like cps locus from a serotype 19F pneumococcal isolate indicates continued need of serology-based quality control for PCR-based serotype determinations // J. Clin. Microbiol. 2009. Vol. 47, No. 7. P. 2353–2354.
9. Wang X., Theodore M.J., Mair R. [et al.]. Clinical validation of multiplex real-time PCR assays for detection of bacterial meningitis pathogens // J. Clin. Microbiol. 2012. Vol. 50, No. 3. P. 702–708.

Поступила в редакцию 03.09.2018.

SEROLOGICAL MONITORING BY EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF VACCINE PROPHYLAXIS OF PNEUMOCOCCAL INFECTION IN ORGANIZED GROUPS OF CHILDREN

D.S. Kolesnik¹, A.E. Goncharov^{1,2}, V.V. Kolodzieva¹, L.Yu. Nilova¹, V.V. Netchaev¹, E.A. Orishak¹

¹North-West State Medical University named after I.I. Mechnikov (41 Kirohnaya St. Saint-Petersburg 191015 Russian Federation),

²Institute of Experimental Medicine (12 Academician Pavlov St. 197376 Saint-Petersburg Russian Federation)

Objective. The study objective is to establish the epidemiological features of *Streptococcus pneumoniae* carrier of different serotypes in organized children groups during vaccinal prevention. **Methods.** 1574 children were examined on the nasal *S. pneumoniae* carriage aged 2–7 y.o., having gone to preschool institutions of St. Petersburg.

Results. The percentage of *S. Pneumoniae* serotype strains covered by the action of 13-valent vaccine, was 36.03 %, that is lower than corresponding value (65.4 %), determined in a similar design study in St. Petersburg in 2010–2013. At the same time, it remained unclear whether this reduction could be considered the result of vaccine prevention, since the level of coverage with preventive vaccinations in the studied population was then quite low.

Conclusions. The wide spread of pneumococcal serotypes, unreached by the action of the 13-valent pneumococcal vaccine, on the one hand, indicates the need for constant monitoring of the pathogen population during mass immunization programs, and on the other hand, it makes it possible to raise the question of the need to expand the antigenic repertoire of the vaccines used.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, vaccine prophylaxis, serological monitoring

УДК 616.915–084:614.47

DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2018.4.91–94

Вакцинопрофилактика кори и пути ее оптимизации на завершающем этапе элиминации инфекции

А.А. Голубкова¹, Т.А. Платонова¹, А.Н. Харитонов², С.С. Смирнова³, С.А. Ковязина⁴¹ Уральский государственный медицинский университет (620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, 3),² Городской центр медицинской профилактики (620063, г. Екатеринбург, ул. 8 Марта, 78А, литер В),³ Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций (620030, г. Екатеринбург, ул. Летняя, 23),⁴ Управление Роспотребнадзора по Свердловской области (620078, г. Екатеринбург, пер. Отдельный, 3)

Проведен ретроспективный анализ заболеваемости корью на территории г. Екатеринбурга за 1988–2017 гг. Установлено, что в современных условиях эпидемический процесс этой инфекции стал прерывистым, что не исключало возможности возникновения локальных вспышек в медицинских организациях, образовательных учреждениях и семьях. При оценке результатов серологического скрининга иммунитета к кори у 369 сотрудников интактных медицинских организаций в период эпиднеблагополучия по кори в 2016 г. было установлено, что до 80% обследованных имели протективный уровень защиты. Наибольшее количество серопозитивных к кори лиц оказалось в возрастной группе старше 50 лет. Среди серонегативных практически 40% сотрудников имели интервал от последнего введения коревой вакцины более 10 лет. В 2014–2016 гг. по результатам планового серологического мониторинга на противокоревые антитела в «индикаторных» группах было подтверждено, что в отдаленные от прививки сроки доля серонегативных к кори лиц составляла до 25%. Полученные данные свидетельствуют о необходимости внесения изменений в схемы иммунизации против кори, в части введения плановой ревакцинации всех групп населения до 50-летнего возраста с интервалом между прививками в 10 лет.

Ключевые слова: корь, вакцинация, серологический мониторинг

В соответствии со стратегическим планом Всемирной организации здравоохранения предполагалось обеспечить элиминацию кори и краснухи во всех регионах мира к концу 2015 г. Основанием для решения данной задачи был высокий охват населения прививками и отсутствие заболеваемости на большинстве территорий [3–6]. Однако, начиная с 2013 г., во многих странах был отмечен беспрецедентный рост заболеваемости корью с активным вовлечением в эпидемический процесс подростков и взрослых, возникновением вспышек инфекции в коллективах и очаговости. Случаи кори имели место даже в тех странах, где длительное время корь не регистрировалась (США, Канада, Австралия и большинство европейских государств) [7–10]. На отдельных административных территориях Российской Федерации заносы кори приводили к ее распространению в семейно-квартирных очагах, образовательных учреждениях и медицинских организациях, преимущественно среди непривитых детей и взрослых [1, 2, 8].

В современных условиях для решения стратегической задачи – элиминации кори, актуальным становится совершенствование системы эпидемиологического надзора за вакцинопрофилактикой данной инфекции в части оптимизации схемы иммунизации.

Цель исследования – по материалам анализа локальной эпидемической ситуации определить ключевые направления совершенствования системы эпидемиологического надзора за коревой инфекцией в конкретных условиях места и времени.

Голубкова Алла Александровна – д-р мед. наук, профессор, заведующая кафедрой эпидемиологии УГМУ, главный внештатный эпидемиолог Уральского Федерального округа; e-mail: allagolubkova@yandex.ru

Материал и методы

Исследование выполнено в 2017–2018 гг. на кафедре эпидемиологии Уральского государственного медицинского университета. Материалом послужили данные официальной регистрации заболеваемости корью населения г. Екатеринбурга за 1988–2017 гг.: формы федерального государственного статистического наблюдения № 1 и 2, материалы государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения Свердловской области», 1221 экстренное извещение (форма 058/у).

Более детально была проанализирована локальная эпидемическая ситуация, которая возникла в мегаполисе в 2016 г. Для анализа использовали 83 донесения о чрезвычайных ситуациях эпидемического характера, 72 карты эпидемиологического расследования случаев заболевания корью или подозрительных на эту инфекцию и 74 медицинские карты стационарных больных (форма 003/у).

Дополнительно анализировали результаты серологического обследования на противокоревые IgG сотрудников интактных медицинских организаций – 369 человек. Серологические исследования выполняли на базе аккредитованных лабораторий методом иммуноферментного анализа (ИФА). Отрицательным результатом ИФА считали концентрацию противокоревых антител менее 0,12 МЕ/мл, сомнительным – 0,12–0,17 МЕ/мл и положительным – равным или более 0,18 МЕ/мл. Результаты скрининга рассматривались с учетом возраста, сферы деятельности и прививочного анамнеза.

За 2014–2016 гг. были проанализированы материалы планового серологического мониторинга

популяционного иммунитета к кори жителей Екатеринбурга в «индикаторных» группах (3–4 года, 9–10, 16–17, 20–29, 30–39 и 40–49 лет), выполненные в лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Свердловской области» методом ИФА.

В работе использовали эпидемиологический, клинический, серологический и статистический методы. Исследование носило ретроспективный характер. Для оценки полученных результатов применяли общепринятые статистические приемы. Тенденции в многолетней динамике заболеваемости определяли по показателям нормированного размаха (расчетный показатель Херста) и среднему темпу роста/снижения заболеваемости. Для оценки активности эпидемических очагов кори рассчитывали такие показатели, как индекс и коэффициент очаговости, а также показатели воспроизводства инфекции (репродуктивные показатели).

Расчеты проводили с помощью пакета прикладных программ Microsoft Office 2007. Достоверность различий оценивали по тесту Стьюдента и критерию Фишера. Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования

В условиях высокого охвата прививками против кори жителей мегаполиса (95–97%) произошли значительные изменения эпидемического процесса этой инфекции. С 1988 по 2001 гг. в городе наблюдалась устойчивая тенденция к снижению заболеваемости. Расчетный показатель Херста за изучаемый период составил 0,6, что также позволяло охарактеризовать многолетнюю динамику заболеваемости корью как трендоустойчивую, со средним темпом ее снижения – 10,87% (рис.).

С 2001 по 2015 гг. на территории мегаполиса индигенных случаев кори не регистрировалось, а единичные ее заносы с эндемичных территорий не имели распространения. Ситуация изменилась в конце 2016 г., когда в Екатеринбурге была зарегистрирована вспышка кори, вызванная вирусом генотипа D8, который в предыдущие сезоны циркулировал на территории Малайзии и Индонезии, а в 2015 г. вызвал вспышки кори в Австралии, Новой Зеландии, Германии и Австрии (рис.).

Подъем заболеваемости продолжался 11 недель, за этот период в городе было выявлено 72 клинически и лабораторно подтвержденных случая кори. В возрастной структуре заболевших преобладали дети и подростки до 18-летнего возраста (68,1%), доля взрослых составила 31,9%. Средний возраст у заболевших корью детей соответствовал 3,8 года, у взрослых – 33,2 года. По прививочному анамнезу 68,1% заболевших ранее не были вакцинированы, в том числе по причине отказа от вакцинации – 38,8%, медицинского отвода – 34,7%, возраста – 16,3%. В 10,2% случаев причины отсутствия прививок не были документированы. Среди заболевших, ранее привитых, 30,4% были вакцинированы однократно, 47,9% – двукратно и 21,7% – трехкратно.

Следует отметить, что заболевшие корью из числа ранее привитых не стали активными источниками инфекции для контактировавших с ними лиц. Показатель инцидентности в таких очагах составлял $0,53 \pm 0,15$, тогда как в очагах при контакте с заболевшими, ранее не привитыми – $7,94 \pm 0,56$ ($t=12,78$, $p < 0,05$).

Во время вспышки сформировались 59 локальных очагов кори с различным количеством пострадавших, в том числе 36 семейно-квартирных очагов, 14 – в организованных коллективах и 9 – в медицинских организациях. Наиболее активное распространение инфекции зарегистрировано в медицинских организациях, где показатель воспроизводства инфекции достигал самого высокого уровня (табл. 1).

Во время вспышки кори среди сотрудников интактных медицинских организаций были выполнены серологические исследования на противокоревые IgG. Установлено, что до 80% из них имели достаточный уровень защиты от кори. Однако по отдельным возрастным группам результаты были неоднозначными. Так, в возрастной категории 18–19 лет доля лиц с серопротекцией и без таковой была одинаковой. По другим возрастным группам наибольшее количество сотрудников (90,5%) с протективным уровнем антител было выявлено среди лиц в возрасте старше 50 лет. Среди отдельных профессиональных групп значимых различий в доле лиц с серопротекцией установлено не было.

Количество аппликаций вакцины не влияло на уровни серопротекции. Среди однократно привитых

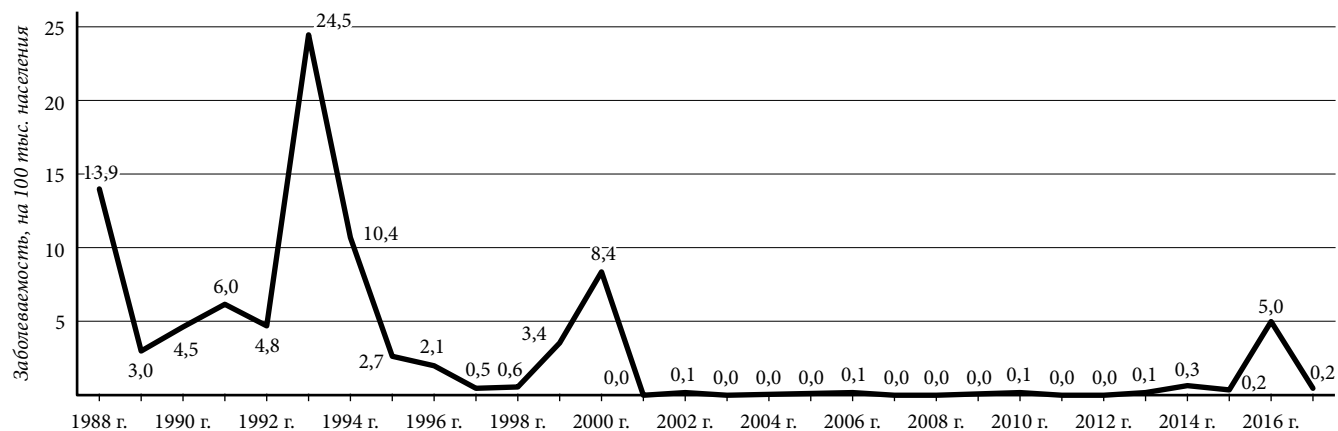


Рис. Заболеваемость корью населения г. Екатеринбурга с 1988 по 2017 гг.

Таблица 1

Характеристика эпидемических очагов кори

Показатель	Очаги		
	семейно-квартирные	в организованных коллективах	в медицинских организациях
Индекс очаговости	1,3	1,1	7,1
Коэффициент очаговости, %	30,6	7,1	55,6
Показатель воспроизводства инфекции	1,1	3,0	10,2

количество лиц с достаточным уровнем защиты составляло 82 %, среди двукратно и трехкратно – 76,6 и 77,8 %, соответственно ($\varphi=0,06$, $p>0,05$). Среди переболевших корью ранее все обследованные имели высокие уровни серопротекции, а сотрудники с отсутствием документированного подтверждения прививки против кори, по результатам ИФА были защищены в 80 %. Необходимо отметить, что с увеличением количества лет, прошедших от даты последней вакцинации, доля лиц без серопротекции увеличивалась. В течение первых 10 лет после последней аппликации живой коревой вакцины она составляла 17 %, через 10 лет – 29,3 %, а через 20 лет – 40 % ($\varphi=2,4$, $p<0,05$).

При анализе результатов серологического скрининга на противокоревые IgG в «индикаторных» группах мы учитывали рекомендации ВОЗ, согласно которым критерием эпидемического благополучия по кори считается выявление не более 7 % серонегативных представителей как в популяции в целом, так и в каждой «индикаторной» группе. По результатам нашего исследования фактическая доля серонегативных к кори лиц на уровне 6–7 % в 2014 г. была зарегистрирована в двух возрастных группах – 3–4 года и 30–39 лет. В других возрастных группах во все анализируемые годы количество серонегативных проб было выше критерия эпидемического благополучия, а в отдельные годы достигало даже 25 % (табл. 2).

В ближайшие сроки после вакцинации и ревакцинации против кори (3–4 года и 9–10 лет) доля серонегативных лиц в среднем не превышала 10,8 %. В возрасте 16–17 лет, к периоду окончания школы и формированию новых коллективов в высших и средних специальных учебных заведениях, доля лиц без серопротекции увеличивалась более чем в два раза, составляя в среднем 21,1 %, с максимально высоким уровнем в 2016 г. (табл. 2). Следовательно, каждый четвертый подросток при выходе во взрослую жизнь не был защищен против кори.

Среди лиц в возрасте от 20 до 50 лет, количество серонегативных составляло в среднем 13 %, с колебаниями в отдельные годы от 18 до 24,5 %, т.е. в 3–4 раза превышало критерии эпидблагополучия, что также можно считать неблагоприятным прогностическим признаком для коревой инфекции на нашей территории.

Таблица 2

Результаты серологического мониторинга коллективного иммунитета к кори в «индикаторных» группах населения за 2014–2016 гг.

«Индикаторная» группа		2014 г.	2015 г.	2016 г.
3–4 года	всего обследовано	148	101	197
	число серонегативных	11	10	21
	% серонегативных	7,4	9,9	10,6
9–10 лет	всего обследовано	92	100	260
	число серонегативных	12	11	35
	% серонегативных	13,0	11,0	13,4
16–17 лет	всего обследовано	136	206	223
	число серонегативных	23	44	56
	% серонегативных	16,9	21,4	25,1
20–29 лет	всего обследовано	159	101	93
	число серонегативных	13	15	12
	% серонегативных	8,2	14,9	12,9
30–39 лет	всего обследовано	200	299	283
	число серонегативных	12	38	51
	% серонегативных	6,0	12,7	18,0
40–49 лет	всего обследовано	183	100	114
	число серонегативных	17	10	28
	% серонегативных	9,3	10,0	24,5
Итого:	всего обследовано	918	907	1172
	число серонегативных	88	128	204
	% серонегативных	9,6	14,1	17,4

Обсуждение полученных данных

Несмотря на положительные тенденции в направлении элиминации кори, она по-прежнему остается актуальной инфекцией, оставляя за собой возможности для распространения среди непривитых детей, а также серонегативных подростков и взрослых.

Наиболее активно в эпидемический процесс при контакте с коревым больным вовлекались дети дошкольного возраста, не вакцинированные против кори по возрасту, медицинским противопоказаниям или в связи с отказом родителей. Значимость заболевших корью, ранее привитых, как потенциальных источников инфекции, в очагах была невысокой, показатель распространения инфекции при контакте с ними составлял $0,53 \pm 0,15$, тогда как при контакте с заболевшими, ранее не привитыми от кори – $7,94 \pm 0,56$. При локальных вспышках наиболее активное распространение инфекции происходило в медицинских организациях с формированием вторичных очагов по маршрутам следования заболевших детей и взрослых.

По результатам серологического скрининга на противокоревые IgG установлено, что до 80 % сотрудников медицинских организаций имели протективный уровень специфических антител. Наибольшее количество таких лиц зарегистрировано в возрасте старше 50 лет. Очень важно, что через десять и более лет от последней вакцинации до 40 % медицинских сотрудников становились серонегативными и могли быть отнесены в группы риска возникновения инфекции.

Не менее значимые результаты были получены и при оценке данных планового серологического мониторинга иммунитета к кори в «индикаторных» группах населения. Превышение допустимого количества серонегативных лиц (более 7%) в «индикаторных» группах регистрировалось как в ближайшие, так и в отдаленные сроки после вакцинации и ревакцинации против кори. Наиболее неблагоприятные показатели серопротекции были получены среди подростков 16–17 лет и взрослых.

Заключение

В современных условиях эпидемический процесс кори стал прерывистым, однако с опасностью возникновения локальных вспышек инфекции. В связи с этим, вопросам организации вакцинации населения следует уделять особое внимание. Для контроля эпидемической ситуации по кори необходимо поддерживать высокий охват населения прививками в декретированных Национальным календарем прививок группах (12 мес. и 6 лет) не менее чем на уровне 95–98%, а также поставить вопрос о плановой ревакцинации населения до 50-летнего возраста с интервалом между прививками в 10 лет.

Литература / References

1. Голубкова А.А., Платонова Т.А., Харитонов А.Н. [и др.]. Корь. Характеристика эпидемического процесса и его детерминант в условиях реального времени (на примере вспышки кори в Екатеринбурге в 2016 г.) // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2017. № 6. С. 54–58.
Golubkova A.A., Platonova T.A., Kharitonov A.N. [et al.]. Measles. Characteristics of the epidemic process and its determinants in real time (on the example of measles outbreak in Yekaterinburg in 2016) // *Epidemiology and Vaccine Prophylaxis*. 2017. No. 6. P. 54–58
2. Голубкова А.А., Платонова Т.А., Харитонов А.Н. [и др.]. Эпидемический процесс коревой инфекции в период ее элиминации и стратегические направления контроля в условиях реального времени // Пермский медицинский журнал. 2017 № 4. С. 67–73.
Golubkova A.A., Platonova T.A., Kharitonov A.N. [et al.]. Epidemic process of measles infection during its elimination and strategic directions of control in real time // *Perm Medical Journal*. 2017. No. 4. P. 67–73.
3. Национальный план мероприятий по реализации программы «Элиминация кори и краснухи в Российской Федерации» (2016–2020 гг.). МЗ РФ, 2015. 33 с.
National action plan for the implementation of the programme "Elimination of measles and rubella in the Russian Federation" (2016–2020). Ministry of Health of the Russian Federation, 2015. 33 p.
4. Программа «Элиминация кори и краснухи в Российской Федерации» (2016–2020 гг.). URL: <http://legalacts.ru/doc/programma-eliminatsija-kori-i-krasnukhi-v-rossiiskoi-federatsii-2016/> (дата обращения: 30.04.2018 г.).
The program "Elimination of measles and rubella in the Russian Federation" (2016–2020). URL: <http://legalacts.ru/doc/programma-eliminatsija-kori-i-krasnukhi-v-rossiiskoi-federatsii-2016/> (date of access: 30.04.2018).
5. Цвиркун О.В. Эпидемический процесс кори в различные периоды вакцинопрофилактики: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 2014. 46 с.
Tsvirkun O.V. Epidemic process of measles in different periods of vaccine prophylaxis: author's abstract of dissertation of doctor of medical Sciences. Moscow, 2014. 46 p.
6. Цвиркун О.В., Герасимова А.Г., Тихонова Н.Т. [и др.]. Структура заболевающих корью в период элиминации // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2012. № 2. С. 21–25.
Tsvirkun O.V., Gerasimova A.G., Tihonova N.T. [et al.]. The structure of cases of measles in the period of elimination // *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2012. No. 2. P. 21–25.
7. Gibney K.B., Brahma A., O'Hara M. [et al.]. Challenges in managing a school-based measles outbreak in Melbourne, Australia, 2014 // *Australian and New Zealand Journal of Public Health*. 2017. Vol. 41. P. 80–84.
8. Golubkova A.A., Platonova T.A., Olshvang O.Yu. [et al.]. Measles: manifestations at the stage of elimination of infection and directions for effective management of the epidemic process // *The Medical-Surgical Journal of the Physicians and Naturalist Society from Iasi*. 2018. Vol. 122, No. 1. P. 146–152.
9. Magurano F., Baggieri M. Towards measles elimination in Italy: Virological surveillance and genotypes trend (2013–2015) // *Virus Research*. 2017. Vol. 236. P. 24–29.
10. Werber D., Hoffmann A., Santibanez S. [et al.]. Large measles outbreak introduced by asylum seekers and spread among the insufficiently vaccinated resident population, Berlin, October 2014 to August 2015 // *Eurosurveillance*. 2017. No. 22. P. 1–8.

Поступила в редакцию 08.05.2018.

VACCINE PROPHYLAXIS OF MEASLES AND WAYS OF ITS OPTIMIZATION AT THE FINAL STAGE OF INFECTION ELIMINATION

A.A. Golubkova¹, T.A. Platonova¹, A.N. Kharitonov², S.S. Smirnova³, S.A. Kovyazina⁴

¹ Ural State Medical University (3 Repina St. Ekaterinburg 620028 Russian Federation), ² City Center of Medical Prevention (liter V 78a 8 Marta St. Ekaterinburg 620063 Russian Federation), ³ Ekaterinburg Research Institute of Viral Infections (23 Letnyaya St. Ekaterinburg 620030 Russian Federation), ⁴ The administration of Rospotrebnadzor in the Sverdlovsk region (3 Otdelnyi St. Ekaterinburg 620078 Russian Federation)

Objective. The purpose of the study – based on the analysis of the local epidemic situation to determine the key areas for improving the system of epidemiological surveillance of measles infection in specific conditions of time and place.

Methods. As materials of the research were used data from the official registration of the incidence of measles the population of Ekaterinburg for 1988–2017, medical documentation of cases of measles in 2016, the results of serological screening for measles IgG employees of medical organizations in the period of outbreaks of measles and materials routine serological monitoring of measles immunity in the "indicator" populations for 2014–2016 used in epidemiological, clinical, serological and statistical research methods.

Results. It is established that in modern conditions the epidemic process of measles in the metropolis has become intermittent, which does not exclude the occurrence of a local outbreak, with primary involvement in the epidemic process of previously unvaccinated children and adults, with the most active spread of infection in medical organizations. Serological studies of immunity to measles, conducted among employees of medical organizations, showed that up to 80% of the surveyed in the IFA had a protective level of prtokorevyh antibodies, with the largest number of such persons in the age group over 50 years. Among seronegative to 40% of employees had an interval from the last vaccination for more than 10 years. When analyzing the results of planned serological monitoring of anticorruption immunity in the "indicator" groups, it was found that the excess of the permissible number of seronegative persons (more than 7%) in the "indicator" groups occurred both in the short and long terms after vaccination and revaccination. The most unfavourable indicators of seroprotection were obtained among adolescents aged 16–17 and adults.

Conclusions. To control the epidemic situation of measles, it is necessary to maintain vaccination coverage of children in the age groups (12 months) in the national vaccination calendar (6 years) at least 95–98%, as well as to decide on the planned revaccination of the population under 50 years of age with an interval between vaccinations at 10 years.

Keywords: measles, vaccination, serological monitoring

УДК 616-002.5-036.2(571.13)

DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2018.4.95-100

Туберкулез с множественной и широкой лекарственной устойчивостью в Омской области: основные тенденции и характеристики

О.А. Пасечник¹, А.А. Зимогляд², И.В. Ярусова³, С.В. Витрив³, А.И. Блох¹

¹ Омский государственный медицинский университет (644099, г. Омск, ул. Ленина, 12),

² Центр гигиены и эпидемиологии в Омской области (644116, г. Омск, ул. 27-я Северная, 42а),

³ Клинический противотуберкулезный диспансер (644058, г. Омск, ул. Целинная, 2)

На территории Омской области в 2006–2017 гг. выявлены качественные и количественные изменения параметров эпидемического процесса туберкулезной инфекции. На фоне снижения заболеваемости туберкулезом до уровня 62,2 на 100 тыс. населения наблюдалась смена возрастной структуры впервые выявленных больных, рост доли пациентов, коинфицированных ВИЧ до 22%, увеличение доли выделителей микобактерий с множественной и широкой устойчивостью возбудителя. Заболеваемость населения этой формой туберкулеза составила 1,6, а распространенность – 13,6 на 100 тыс. населения и характеризовалась выраженной тенденцией к росту. В сложившихся условиях региональная система эпидемиологического надзора требует новых подходов к оптимизации с учетом изменений параметров эпидемического процесса.

Ключевые слова: туберкулез, лекарственная устойчивость, заболеваемость, распространенность

Туберкулез занимает 9-е место в мире среди ведущих причин смерти и служит сегодня наиболее частой причиной летальных исходов среди инфекционных заболеваний, опережая ВИЧ-инфекцию [9]. Со времени появления штаммов микобактерий с множественной лекарственной устойчивостью (ЛУ) в 1990-х годах наблюдается постоянный рост распространенности лекарственно-устойчивого туберкулеза, что затрудняет борьбу с этим заболеванием [12]. В 2016 г. в мире было выявлено 490 000 случаев туберкулеза с множественной ЛУ, почти половина из которых (47%) пришлось на три страны – Индию, Китай и Россию [9].

Широкая ЛУ возбудителя туберкулеза рассматривается как вариант множественной ЛУ, которая представляет собой резистентность одновременно к изониазиду и рифампицину, а также к фторхинолонам и инъекционным препаратам второй линии (канамицин, амикацин, капреомицин) [4]. Туберкулез с широкой ЛУ – почти неизлечимая форма заболевания – был зарегистрирован в 2008 г. в 58 странах, доля таких возбудителей среди штаммов с множественной ЛУ составляла по разным оценкам до 15% [8]. Резистентность микобактерий к действию противотуберкулезных препаратов серьезно угрожает борьбе с туберкулезом во всем мире и вызывает обеспокоенность в связи с возвращением к эпохе отсутствия эффективных лекарств от этой болезни [13]. В настоящее время в мире успех лечения туберкулеза с множественной ЛУ достигается у 54%, а туберкулеза с широкой ЛУ – у 30% пациентов [9]. Формируемый в результате неадекватного лечения и усугубляющийся пренебрежением мерами инфекционного контроля и комплекса противоэпидемических мероприятий, туберкулез с множественной и с широкой ЛУ отражает недостаточность системы глобального эпидемиологического надзора

за этой инфекцией [10]. Туберкулез с широкой ЛУ ограничивает терапевтические возможности, лечение становится более продолжительным, токсичным и дорогостоящим и менее эффективным, имеющим худшие результаты, что определяет новое качество состояния больных как в эпидемиологическом, так и в клиническом плане [6, 11].

Систематические данные об эпидемиологии туберкулеза с широкой ЛУ остаются ограниченными, и в большинстве исследований основное внимание уделяется молекулярно-генетическим аспектам выборочных популяций, хотя знание частоты распространения широкой ЛУ актуально для планирования ресурсного обеспечения обследований, лечения и противоэпидемических мероприятий в очагах инфекции [2].

Цель настоящего исследования состояла в характеристике эпидемиологических проявлений туберкулезной инфекции и оценке распространенности туберкулеза с множественной и широкой ЛУ на территории Омской области.

Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ОмГМУ (заключение № 101 от 08.02.2018 г.).

Материалы и методы

В основу исследования положено наблюдение за эпидемическим процессом туберкулезной инфекции на территории Омской области в 2006–2017 гг. Материалом послужили данные форм федерального статистического наблюдения «Сведения о больных туберкулезом» (№ 33), «Сведения о заболеваниях активным туберкулезом» (№ 8), «Сведения о болезни, вызванной вирусом иммунодефицита человека» (№ 61) и бактериограммы впервые выявленных больных туберкулезом. Были использованы наблюдательные дескриптивные и аналитические методы эпидемиологического исследования. Выравнивание динамических рядов показателей

осуществлялось по методу наименьших квадратов. Уровень и структура заболеваемости оценивались по интенсивным (инцидентности, превалентности) и экстенсивным (долевым) показателям.

Изучение чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к лекарственным препаратам основного и резервного рядов проведено методом абсолютных концентраций на плотной питательной среде Левенштейна-Йенсена. Критические концентрации для определения резистентности были следующими: изониазид – 1 мкг/мл, рифампицин – 40 мкг/мл, этамбутол – 2 мкг/мл, стрептомицин – 10 мкг/мл, офлоксацин – 2 мкг/мл, капреомицин – 30 мкг/мл, канамицин – 30 мкг/мл.

Для медико-социальной характеристики впервые выявленных больных туберкулезом с широкой ЛУ были изучены биологические (пол, возраст), социальные (место проживания, место работы, пребывание в пенитенциарных учреждениях в анамнезе) и медицинские (клиническая форма туберкулезной инфекции, наличие сопутствующей инфекционной патологии) параметры.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного пакета Statistica 6.0 (StatSoft Inc.) и возможностей Microsoft Excel. Для установления статистически достоверных различий использовали отношение шансов. Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Результаты исследования

На территории Омской области за 2006–2017 гг. наблюдалась умеренная тенденция к снижению заболеваемости населения всеми формами туберкулеза с темпом снижения 2,9%. После периода подъема уровня заболеваемости с 2006 по 2009 г. со среднемноголетним показателем 112,7 на 100 тыс. населения, отмечалось ее уменьшение с минимальным средним показателем к концу изучаемого периода (рис. 1).

Наряду со снижением заболеваемости населения области отмечено сокращение смертности от ту-

беркулеза (с 24,7 до 7,6 на 100 тыс. населения, темп снижения – 4,1%), а также распространенности туберкулезной инфекции (с 343,3 до 130,2 на 100 тыс. населения, темп снижения – 3,9%). Однако на фоне общего оздоровления эпидемиологической ситуации сохранялись общемировые негативные тенденции, связанные с распространением туберкулеза, вызванного лекарственно-устойчивыми возбудителями, а также активным вовлечением в эпидемический процесс больных ВИЧ-инфекцией.

В структуре впервые выявленных больных туберкулезом доля бактериовыделителей возросла с 39,8% в 2006 г. до 56% в 2017 г. Заболеваемость бациллярными формами на протяжении изучаемого периода оставалась стабильной (среднемноголетний показатель – 39,4 на 100 тыс. населения). Среди впервые выявленных бактериовыделителей увеличивалась доля лиц, выделяющих микобактерии с множественной ЛУ (с 24,1 до 30,5%), но заболеваемость туберкулезом с множественной ЛУ оставалась стабильной со среднемноголетним показателем 7,9 на 100 тыс. населения.

Хотя в целом распространенность туберкулеза в Омской области сократилась более чем в 2,6 раза, распространенность туберкулеза с множественной ЛУ возбудителя сохранялась весь период примерно на одном уровне – среднемноголетний показатель составлял 35,2 на 100 тыс. населения (рис. 2).

Для оценки изменений в структуре заболеваемости туберкулезом, а также характеристики впервые выявленных больных, мы сравнили две когорты пациентов в начале и конце анализируемого периода (табл. 1). Было показано, что количество случаев туберкулеза, впервые диагностированных в 2017 г., значительно сократилось и составило 62,2 на 100 тыс. населения, в сравнении с 2006 г. число заболевших уменьшилось на 965 человек. Среди заболевших преобладали мужчины, в половой структуре впервые выявленных случаев туберкулеза произошли достоверные изменения, связанные с уменьшением доли женщин в 2017 г. Также здесь выросла доля городских жителей, и большинство наблюдений пришлось на

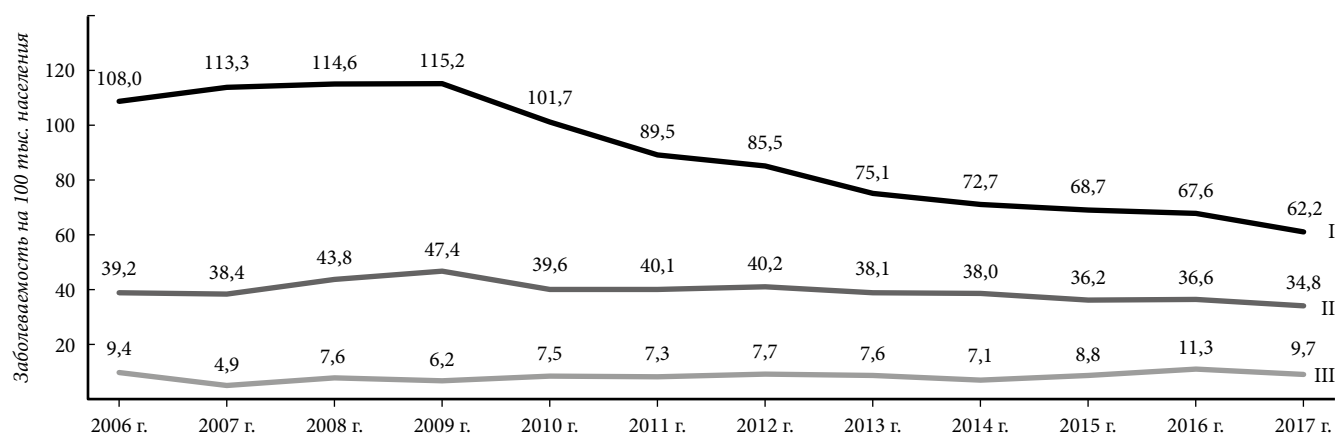


Рис.1. Динамика заболеваемости туберкулезом населения Омской области в 2006–2017 гг.:

I – общая заболеваемость, II – заболеваемость бациллярными формами, III – заболеваемость с множественной ЛУ.

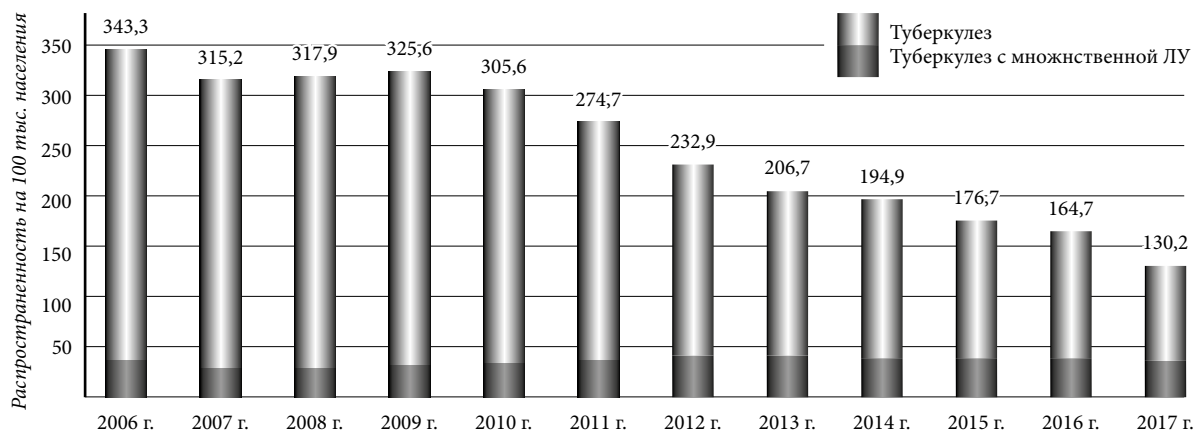


Рис. 2. Динамика распространенности туберкулезной инфекции, в т.ч. туберкулеза с множественной ЛУ, в Омской области в 2006–2017 гг.

Таблица 1

Характеристика когорт впервые выявленных больных туберкулезом на территории Омской области в 2006 и 2017 гг.

Показатель	Кол-во наблюдений				ОШ ^а	95% ДИ ОШ ^б	p	
	2006 г.		2017 г.					
	абс.	%	абс.	%				
Всего больных	2466	–	1501	–	–	–	–	
Пол	муж.	1674	67,8	1062	70,7	1,00	–	–
	жен.	792	32,2	439	29,3	0,87	0,76–1,00	0,05
Городские жители	1668	67,6	1110	74,0	1,00	–	–	
Сельские жители	798	32,4	391	26,0	0,73	0,63–0,84	0,001	
Возрастные группы, лет	до 18	124	5,0	70	4,7	1,00	–	–
	18–24	341	13,8	92	6,1	0,47	0:32–0,69	0,0001
	25–34	557	22,6	404	26,9	1,28	0,93–1,76	0,12
	35–44	474	19,2	480	32,0	1,80	1,30–2,46	0,0003
	45–54	538	21,8	203	13,5	0,66	0,47–0,93	0,01
	55–64	206	8,4	155	10,3	1,30	0,93–1,91	0,11
	65 и более	226	9,2	97	6,5	0,76	0,50–1,10	0,15
Локализация	органы дыхания	2408	97,6	1473	98,1	1,00	–	–
	внелегочный	58	2,4	28	1,8	0,78	0,05–1,24	0,3
Бактериовыделение	963	39,0	842	56,0	1,00	–	–	
Закрытые формы	1503	61,0	659	44,0	0,50	0,44–0,57	0,0	
Множественная ЛУ ^б	192	24,0	191	30,5	1,00	–	–	
Чувствительность и др. виды ЛУ ^б	606	76,0	435	69,5	1,40	1,10–1,75	0,006	
Наличие полостей распада ^г	798	41,0	404	33,7	1,00	–	–	
Без распада	1150	46,6	792	52,7	1,36	1,17–1,58	0,001	
Фиброзно-кавернозная форма	200	8,1	19	1,3	6,80	4,26–11,0	0,0	
КУМ в мазке ^д	770	80,0	500	59,4	2,72	2,21–3,36	0,003	
ВИЧ-статус ^е	положительный	28	1,4	269	22,0	1,00	–	–
	отрицательный	1975	98,6	1232	78,0	0,06	0,04–0,09	0,0
Пенитенциарный анамнез	268	10,9	163	10,9	1,00	0,81–1,23	0,99	
Посмертная диагностика	89	3,6	27	1,8	2,00	1,32–3,16	0,001	
Рецидив туберкулеза ^д	248	3,5	258	9,6	1,85	1,53–2,23	0,0	

^а Отношение шансов.

^б 95%-ный доверительный интервал отношения шансов.

^в Среди обследованных на чувствительность к противотуберкулезным препаратам.

^г На начало лечения.

^д Статус микроскопии мазка на начало лечения бактериовыделителей. КУМ – кислотоустойчивые микобактерии.

^е Из числа обследованных на антитела к вирусу иммунодефицита человека.

^д Выявленный в отчетном году среди контингента больных, состоявших на диспансерном учете.

Таблица 2

Структура первичной ЛУ 689 штаммов *M. tuberculosis*, изолированных от больных туберкулезом в 2017 г.

Спектр устойчивости	Кол-во штаммов	
	абс.	%
Чувствительны ко всем препаратам	332	48,2
Устойчивы к препаратам	357	51,8
<i>в т.ч. монорезистентны</i>	50	14,0
<i>в т.ч. полирезистентны</i>	68	19,1
Множественная ЛУ	239	66,9
<i>в т.ч. широкая ЛУ</i>	31	8,7

возрастные группы 25–34-, 35–44- и 45–54-летних пациентов. Установлено достоверное увеличение к 2017 г. доли лиц в возрасте 35–44 года и уменьшение относительного количества заболевших в возрасте 18–24 и 45–54 лет. Среди впервые выявленных больных туберкулезом значительно возросла доля лиц, коинфицированных ВИЧ (табл. 1).

Ряд показателей позволил косвенно оценить качество профилактических мероприятий, направленных на раннее выявление туберкулеза. В когорте больных 2017 г. увеличилась доля пациентов с туберкулезом органов дыхания без деструктивных изменений легочной ткани, значительно уменьшилось количество бактериовыделителей, установленных методом простой микроскопии, почти в два раза сократилась доля случаев туберкулеза, диагностированных посмертно, более чем в шесть раз уменьшилось относительное число больных фиброзно-кавернозным туберкулезом. Одновременно возросла доля рецидивов заболевания, зарегистрированных в отчетном году (табл. 1).

Среди впервые выявленных случаев частота туберкулеза органов дыхания оставалась максимальной в течение всего изучаемого периода, при этом увеличилась доля лиц с установленным бактериовыделением при уменьшении доли больных с сохраненной чувствительностью к противотуберкулезным препаратам, а также с моно- и полирезистентностью. Частота диагностики множественной ЛУ к 2017 г. также увеличилась (табл. 1).

В 2017 г. при бактериологическом обследовании впервые выявленных случаев туберкулеза культуральным методом было изолировано 689 штаммов *M. tuberculosis*, более половины из которых характеризовались различными видами ЛУ (табл. 2).

Среди лекарственно-устойчивых штаммов 91,5 % были нечувствительны к изониазиду, как одному препарату (6,1 % всех штаммов с ЛУ), так и в различных его комбинациях: со стрептомицином – 15,7 %, с рифампицином – 66,9 % штаммов. Устойчивость к стрептомицину была обнаружена у 303 изолятов (84,8 %), причем штаммы с множественной лекарственной устойчивостью в 89,1 % случаях были резистентны и к стрептомицину в комбинациях «изониа-

Таблица 3

Спектр первичной ЛУ 357 штаммов *M. tuberculosis*

Спектр ЛУ*	Кол-во штаммов		Доля от всех видов ЛУ, %
	абс.	%	
Монорезистентность	50	100,0	14,0
И	22	44,0	6,1
Р	2	4,0	0,6
С	24	48,0	6,7
Э	2	4,0	0,6
Полирезистентность	68	100,0	19,1
И+С	56	82,3	15,7
И+Э	1	1,5	0,3
Р+С	1	1,5	0,3
С+Э	1	1,5	0,3
И+С+Э	9	13,2	2,5
Множественная ЛУ	239	100,0	66,9
И+Р	23	9,6	6,4
И+Р+С	116	48,5	32,4
И+Р+Э	3	1,3	0,9
И+Р+С+Э	97	40,6	27,2
<i>в т.ч. широкая ЛУ</i>	31	100,0	8,7
И+Р+О+Кан	20	64,5	5,6
И+Р+О+Кап	3	9,7	0,9
И+Р+О+Кан+Кап	8	25,8	2,2

* И – изониазид, Р – рифампицин, С – стрептомицин, Э – этамбутол, О – офлоксацин, Кан – канамицин, Кап – капреомицин.

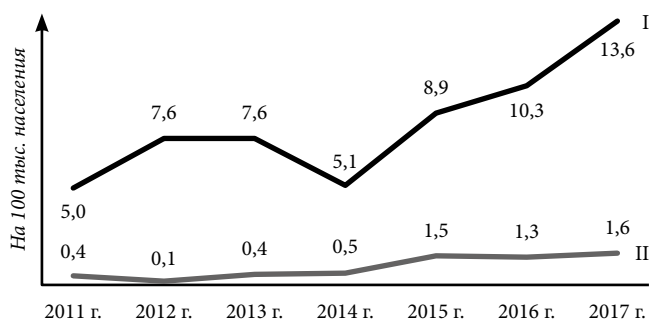


Рис.3. Динамика заболеваемости и распространенности туберкулеза с широкой ЛУ в Омской области в 2011–2017 гг.:

I – распространенность туберкулеза с широкой ЛУ, II – заболеваемость туберкулезом с широкой ЛУ.

зид–рифампицин–стрептомицин» и «изониазид–рифампицин–стрептомицин–этамбутол». К рифампицину были резистентны 242 изолята (67,7 %), чаще в комбинации с изониазидом (табл. 3).

Качественные изменения бактериовыделения у больных туберкулезом характеризовались как увеличением доли лиц, выделяющих микобактерии с широкой ЛУ (с 4,2 % в 2011 г. до 15 % в 2017 г.), так и выразенными тенденциями к росту заболеваемости и распространенности широкой ЛУ: темп прироста 30,6 и 14 %, соответственно (рис. 3).

Динамика заболеваемости туберкулезом с широкой ЛУ позволяет охарактеризовать часть микобактериальной популяции, циркулирующей на территории Омской области, что имеет важное значение для определении степени напряженности эпидемиологической ситуации. В 2017 г. 31 впервые выявленный больной туберкулезом из 357 выделял микобактерии с широкой ЛУ (8,7%). Заболеваемость населения области туберкулезом с широкой ЛУ возбудителя составила в 2017 г. 1,6, а распространенность – 13,6 на 100 тыс. населения. Доля мужчин в контингенте впервые выявленных больных туберкулезом с широкой ЛУ составила 80,6% (25 человек), средний возраст – 38,2 года (25–66 лет). Средний возраст заболевших женщин был 44,5 года (30–80 лет). Городские жители были представлены в 54,8% случаев (17 человек). Социальный статус пациентов: безработные – 67,7% (21 человек), пенсионеры – 9,6% (3 человека), медицинские работники – 6,4% (2 человека), рабочие прочих специальностей – 16,1% (5 человек). В местах лишения свободы ранее находились четверо больных (12,9%).

Структура клинических форм туберкулеза с широкой ЛУ распределилась следующим образом: инфильтративный туберкулез легких – 64,5%, диссеминированный туберкулез легких – 16,2%, очаговый туберкулез легких – 12,9%, фиброзно-кавернозный туберкулез – 3,2%, туберкулез внутригрудных лимфоузлов – 3,2%. В 32,2% наблюдений туберкулез сочетался с ВИЧ-инфекцией, в 35,5% – с вирусным гепатитом С, в 6,4% – с вирусным гепатитом В. Злоупотребляли алкоголем 41,9% больных, 9,5% были потребителями инъекционных наркотиков. В ходе эпидемиологического расследования установлено, что 35,4% пациентов в анамнезе имели контакт с больными туберкулезом. В 23 случаях (74,1% больных) в этой группе выявлена устойчивость к изониазиду, рифампицину, офлоксацину и канамицину в сочетании с другими противотуберкулезными препаратами: 48,3% пациентов были резистентны к капреомицину, 58% – к этамбутолу, 87,1% – к стрептомицину. У 9 больных (29%) выявлена резистентность к комбинации из шести противотуберкулезных препаратов (стрептомицину, изониазиду, рифампицину, этамбутолу, канамицину и офлоксацину) в сочетании с другими лекарственными средствами первого ряда, у 12 больных (38,7%) – к комбинации из семи препаратов: стрептомицину, изониазиду, рифампицину, этамбутолу, канамицину, офлоксацину и капреомицину.

Обсуждение полученных данных

На протяжении последнего десятилетия в большинстве регионов Российской Федерации отмечено снижение уровня заболеваемости туберкулезной инфекцией [2]. В Омской области в динамике заболеваемости туберкулезом наблюдается умеренная тенденция к снижению количества случаев. Однако

эпидемический процесс характеризуется качественными изменениями его составляющих. Сравнительный анализ когорт больных 2006 и 2017 гг. позволил определить, что в возрастной структуре впервые заболевших туберкулезом значительно возросла доля лиц в возрасте 35–44 года. Доля ВИЧ-инфицированных лиц также возросла: к концу периода наблюдения практически каждый четвертый впервые выявленный пациент демонстрировал положительные реакции на ВИЧ. Среди новых случаев туберкулеза увеличилась доля наблюдений с установленным бактериовыделением. Следует отметить, что при одновременном уменьшении количества случаев туберкулеза органов дыхания с деструктивными изменениями в легких, увеличение доли бактериовыделителей может происходить в том числе и за счет улучшения качества лабораторной диагностики.

Вместе с тем заболеваемость туберкулезом с множественной ЛУ возбудителя и его распространенность растет, как в России, так и во многих регионах мира [2, 6, 8]. Учитывая значимость таких изменений, Всемирная организация здравоохранения внедрила глобальную программу эпиднадзора, результаты которой выявили региональные и национальные различия в распространенности туберкулеза с ЛУ [15]. Хотя широкую ЛУ можно назвать относительно новым термином, подобные случаи туберкулеза регистрируются уже более десяти лет [8, 10]. Сообщалось, что распространенность туберкулезной инфекции с широкой ЛУ среди случаев с множественной ЛУ варьирует в мире от 6,6 до 23,7% [15]. К концу 2012 г. 92 страны сообщили по меньшей мере об одном случае туберкулеза с широкой ЛУ. В среднем около 9,6% туберкулезной инфекции с множественной ЛУ включают случаи с широкой ЛУ [14]. Доля последних была самой высокой в Беларуси (29%), Грузии (15%), Латвии (19%) и Литве (25%) [5].

В отечественных формах федерального и ведомственного статистического наблюдения сведения о числе больных туберкулезом с широкой ЛУ, как выявленных, так и состоящих под наблюдением, отсутствуют [2]. Данные на этот счет в нашей стране пока ограничены, хотя изменения в форме федерального статистического наблюдения № 61 дали возможность оценить их в группе ВИЧ-инфицированных лиц. Так, в 2016 г. в целом в России доля больных ВИЧ-ассоциированным туберкулезом с широкой ЛУ составила 5,6% среди бактериовыделителей, в Северо-Западном федеральном округе – 9,5%, в Приволжском – 9,7%, в Сибирском – 3,1%, в Центральном – 3,3%, в Уральском – 2,8%, в Дальневосточном – 1,3% [1].

Результаты нашего исследования показали наличие умеренной тенденции к росту заболеваемости туберкулезом с ЛУ, но вместе с тем – выраженной тенденции к росту заболеваемости туберкулезом с широкой ЛУ. Это происходит на фоне снижения заболеваемости и смертности от туберкулеза. Отмечено несколько

факторов риска, влияющих на формирование множественной и широкой ЛУ, ведущим среди которых считается неадекватное лечение туберкулеза [7]. Вместе с тем признано, что рост доли лекарственно-устойчивых форм заболевания может происходить и в результате успешного и эффективного лечения лекарственно-чувствительного туберкулеза за счет элиминации его из общей популяции больных [3].

Таким образом, в сложившихся условиях инфекционный контроль и адекватные противоэпидемические мероприятия играют важную роль в предупреждении распространения туберкулеза. Региональная система эпидемиологического надзора требует новых подходов к оптимизации с учетом изменений параметров эпидемического процесса.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 18-013-00387.

Литература / References

1. Нецаева О.Б. Эпидемическая ситуация по ВИЧ-инфекции в России. URL: <http://mednet.ru/images/stories/files/СМТ/2016vich.pdf> (дата обращения: 18.04. 2018 г.).
2. Sterlikov S., Galkin V., Popova N., [et al.]. Estimated prevalence of tuberculosis with multiple and extensive drug resistance by mathematical modeling in the prisons of the Russian Federation // Scientific-Practical Medical Journal. 2018. No. 1. P. 33–41.
3. Туберкулез в Российской Федерации 2011 г.: аналитический обзор статистических показателей, используемых в Российской Федерации и в мире. М., 2013. 280 с. Tuberkulez v Rossiyskoy Federatsii 2011 g. Analiticheskiy obzor statisticheskikh pokazateley, ispol'zuyemykh v Rossiyskoy Federatsii i v mire. Moscow, 2013. 280 p.
4. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулеза органов дыхания с множественной и широкой лекарственной устойчивостью возбудителя. URL: http://roftb.ru/netcat_files/doks2015/3final.pdf (дата обращения: 24.04.2018 г.). Federalnye klinicheskie rekomendatsii po diagnostike i lecheniyu tuberkuleza organov dyhaniya s mnozhestvennoj i shirokoj lekarstvennoj ustojchivostyu vozбудitelya. URL: http://roftb.ru/netcat_files/doks2015/3final.pdf (date of access: 24.04.2018).
5. Anti-tuberculosis drug resistance in the world: the WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance 2002–2007. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2008. 120 p.
6. Eker B., Ortmann J., Migliori G.B. [et al.]. Multidrug- and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis, Germany//Emerging Infectious Diseases. 2008. Vol. 14, No. 11. P. 1700–1706.
7. Faustini A., Hall A.J., Perucci C.A. Risk factors for multidrug resistant tuberculosis in Europe: a systematic review // Thorax. 2006. Vol. 61. P. 158–163.
8. Gandhi N.R., Nunn P., Dheda K. [et al.]. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis // Lancet. 2010. Vol. 375, No. 9728. P. 1830–1843.
9. Global tuberculosis report; Document 2017 (WHO/HTM/TB/2004.343) [Internet] Geneva: World Health Organization, 2017. [cited 2018 May 4]. URL: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259366/9789241565516-eng.pdf> (date of access: 24.04.2018).
10. He X.-C., Tao N.-N., Liu Y. [et al.]. Epidemiological trends and outcomes of extensively drug-resistant tuberculosis in Shandong, China // BMC Infect. Dis. 2017. Vol. 17, No. 1. P. 555.
11. Marks S.M., Flood J., Seaworth B. [et al.]. Treatment practices, outcomes, and costs of multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis, United States, 2005–2007 // Emerging Infectious Diseases. 2014. Vol. 20, No. 5. P. 812–821.
12. Qi Y.-C., Ma M.-J., Li D.-J. [et al.]. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis in multi-ethnic region, Xinjiang Uygur Autonomous region, China // PLoS ONE. 2012. Vol. 7, No. 2. P. e32103.
13. Raviglione M. XDR-TB: entering the post-antibiotic era? // Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2006. Vol. 10. P. 1185–1187.
14. Systematic screening for active tuberculosis: principles and recommendations: Document no 2013 (WHO/HTM/TB/2013b04) [Internet] Geneva: World Health Organization; 2013. [cited 2018 May]. URL: http://www.who.int/tb/publications/Final_TB_Screening_guidelines.pdf (date of access: 24.04.2018).
15. Wright A., Zignol M., Van Deun A. [et al.]. Epidemiology of antituberculosis drug resistance 2002–07: an updated analysis of the Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance // Lancet. 2009. Vol. 373. P. 1861–1873.

Поступила в редакцию 22.05.2018.

MULTIDRUG-RESISTANT AND EXTENSIVELY DRUG-RESISTANT TUBERCULOSIS IN THE OMSK REGION: TRENDS AND CHARACTERISTICS

O.A. Pasechnik¹, A.A. Zimoglyad², I.V. Yarusova³, S.V. Vitriv³, A.I. Blokh¹

¹ Omsk State Medical University (12 Lenina St. Omsk 644099 Russian Federation), ² Health and Epidemiology Center in the Omsk Region (42a 27 Severnaya St. Omsk 644116 Russian Federation),

³ Clinical Antituberculous Dispensary (2 Tselinnaya St. Omsk 644058 Russian Federation)

Objective. Micobacteria resistant to antituberculosis drugs endanger the fight against tuberculosis worldwide.

Methods. A retrospective epidemiological study was conducted, based on the observation of the epidemic process of tuberculosis infection in 2006–2017 in Omsk region. We used the data of federal statistical surveillance forms, and also bacteriograms of tuberculosis patients.

Results. Against the background of a decrease in the incidence of tuberculosis to 62.2 per 100 thousand of the population, the age structure of newly diagnosed patients was changed: an increase in the proportion of people aged 35–44 from 19.2 to 31.9%, while reducing the proportion of 18–24 y.o. from 13.8 to 6.1% and 45–54 y.o. from 21.8 to 13.5%. The number of patients co-infected with the human immunodeficiency virus (from 1.4 to 22%) has increased. The incidence of bacterial excretion increased from 39.8 to 56%. 51.8% of mycobacterial isolates were characterized by different types of drug resistance. Among newly-detected bacterial invaders, the proportion of patients with multidrug-resistant mycobacteria increased from 24.1 to 30.5%. The incidence of tuberculosis with extensively drug-resistant tuberculosis was 1.6, and prevalence was 13.6 per 100,000 of population and was characterized by a pronounced upward trend.

Conclusions. Under the circumstances, the regional system of epidemiological surveillance will require new approaches to optimization, taking into account changes in the parameters of the epidemic process.

Keywords: tuberculosis, drug resistance, morbidity, prevalence