

ВЕСТНИК РГМУ

02 / 2017 МАРТ-АПРЕЛЬ
VESTNIKRGMU.RU



МИКРОБИОМ ЧЕЛОВЕКА ОБЗОР

МНЕНИЕ Кишечная микробиота 20

Коррекция состава микробиоты с помощью ингибиторов серин-треониновых протеинкиназ

МЕТОД Метагеномное секвенирование 30

Подготовка библиотек для секвенирования на платформе Illumina

ВЕСТНИК РОССИЙСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО МЕДИЦИНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

НАУЧНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЖУРНАЛ РНИМУ ИМ. Н. И. ПИРОГОВА

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР Денис Ребриков, д. б. н.

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА Александр Эттингер, д. м. н.

РЕДАКТОРЫ ВЫПУСКА

Елена Синева, PhD

Научный сотрудник департамента биохимии и молекулярной биологии Университета Пенсильвании, США

РЕДАКТОРЫ Елена Куликова, Лилия Егорова

КОРРЕКТОР Ольга Комар

ПЕРЕВОДЧИКИ Екатерина Третьякова

РУКОВОДИТЕЛЬ РЕДАКЦИИ Елена Куликова

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

М. Р. Богомильский, член-корр. РАН, д. м. н., профессор. (Москва, Россия)

В. В. Белоусов, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

В. К. Боженко, д. м. н., к. б. н., профессор (Москва, Россия)

Н. А. Былова, к. м. н., доцент (Москва, Россия)

Р. Р. Гайнетдинов, к. м. н. (Санкт-Петербург, Россия)

Е. К. Гинтер, академик РАН, д. б. н. (Москва, Россия)

А. В. Гудков, PhD, DSc (Буффало, США)

Н. В. Гуляева, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

Е. И. Гусев, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

В. Н. Даниленко, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

И. И. Затевахин, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

А. А. Иванов, к. м. н. (Москва, Россия)

Ю. Г. Кжышкова, д. б. н., профессор (Гейдельберг, Германия)

Ю. В. Котелевцев, к. х. н. (Москва, Россия)

М. А. Лебедев, PhD (Дарем, США)

С. А. Мошковский, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

Д. Б. Мунблит, MSc, PhD (Лондон, Великобритания)

В. В. Негребецкий, д. х. н., профессор (Москва, Россия)

А. А. Новиков, д. б. н. (Москва, Россия)

Н. В. Полунина, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Г. В. Порядин, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Г. М. Савельева, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

В. Ф. Семиглазов, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)

Т. А. Славянская, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

В. И. Стародубов, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

В. А. Степанов, член-корр. РАН, д. б. н., профессор (Томск, Россия)

С. В. Сучков, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Х. П. Тахчиди, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Г. Е. Труфанов, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)

О. О. Фаворова, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

М. Л. Филипенко, к. б. н., в. н. с. (Новосибирск, Россия)

Р. Н. Хазипов, д. м. н. (Марсель, Франция)

Н. Л. Шимановский, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Л. Н. Шишкина, д. б. н., с. н. с. (Новосибирск, Россия)

Р. И. Якубовская, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

ДЛЯ ПОДАЧИ РУКОПИСЕЙ editor@vestnikrgmu.ru

ДЛЯ СОТРУДНИЧЕСТВА manager@vestnikrgmu.ru

АДРЕС РЕДАКЦИИ ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997

Журнал включён в РИНЦ. IF 2014: 0,139

Журнал включён в Перечень 27.01.2016 (№ 1760)

Индекс Хирша (h²) журнала по оценке Google Scholar: 3

Здесь находится открытый архив журнала



Свидетельство о регистрации средства массовой информации № 012769 от 29 июля 1994 г.

Учредитель и издатель — Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова (Москва, Россия)

Журнал распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International www.creativecommons.org



Подписано в печать 30.04.2017
Тираж 100 экз. Отпечатано в типографии Print.Formula
www.print-formula.ru

BULLETIN OF RUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

BIOMEDICAL JOURNAL OF PIROGOV RUSSIAN NATIONAL
RESEARCH MEDICAL UNIVERSITY

EDITOR-IN-CHIEF Denis Rebrikov, DSc

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF Alexander Oettinger, DSc

GUEST EDITORS

Elena Sineva, PhD
Research Associate, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Penn State University, USA

EDITORS Elena Kulikova, Liliya Egorova

PROOF-READER Olga Komar

TRANSLATORS Ekaterina Tretiyakova

EDITORIAL MANAGER Elena Kulikova

EDITORIAL BOARD

Bogomilskiy MR, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Belousov VV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Bozhenko VK, DSc, CSc, professor (Moscow, Russia)

Bylova NA, CSc, docent (Moscow, Russia)

Gainetdinov RR, CSc (Saint-Petersburg, Russia)

Ginter EK, member of RAS, DSc (Moscow, Russia)

Gudkov AV, PhD, DSc (Buffalo, USA)

Gulyaeva NV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Gusev EI, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Danilenko VN, DSc, professor (Moscow, Russia)

Zatevakhin II, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Ivanov AA, CSc (Moscow, Russia)

Kzyshkowska YuG, DSc, professor (Heidelberg, Germany)

Kotelevtsev YuV, CSc (Moscow, Russia)

Lebedev MA, PhD (Darem, USA)

Moshkovskii SA, DSc, professor (Moscow, Russia)

Munblit DB, MSc, PhD (London, Great Britain)

Negrebetsky VV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Novikov AA, DSc (Moscow, Russia)

Polunina NV, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Poryadin GV, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Savelieva GM, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Semiglazov VF, corr. member of RAS, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)

Slavyanskaya TA, DSc, professor (Moscow, Russia)

Starodubov VI, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Stepanov VA, corr. member of RAS, DSc, professor (Tomsk, Russia)

Takhchidi KhP, corr. member of RAS, DSc (medicine), professor (Moscow, Russia)

Suchkov SV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Trufanov GE, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)

Favorova OO, DSc, professor (Moscow, Russia)

Filipenko ML, CSc, leading researcher (Novosibirsk, Russia)

Khazipov RN, DSc (Marsel, France)

Shimanovskii NL, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Shishkina LN, DSc, senior researcher (Novosibirsk, Russia)

Yakubovskaya RI, DSc, professor (Moscow, Russia)

FOR PAPERS SUBMISSION editor@vestnikrgmu.ru

FOR COLLABORATION manager@vestnikrgmu.ru

ADDRESS ul. Ostrovityanova, d. 1, Moscow, Russia, 117997

The journal is included in RSCI. IF 2014: 0,139

The journal is included in the list of HAC 27.01.2016 (no. 1760)

Five-year h-index is 3

Free access archive of the journal is here



The mass media registration certificate no. 012769 issued on July 29, 1994

Founder and publisher is Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia)

The journal is distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License www.creativecommons.org



Approved for print 30.04.2017
Circulation: 100 copies. Printed by Print.Formula
www.print-formula.ru

ОБЗОР

5

Микробиом человека

А. В. Чаплин, Д. В. Ребриков, М. Н. Болдырева

The human microbiome

Chaplin AV, Rebrikov DV, Boldyreva MN

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

14

Идентификация аминогликозидфосфотрансфераз клинических штаммов бактерий в микробиоте жителей России

А. С. Ковтун, М. Г. Алексеева, О. В. Аверина, В. Н. Даниленко

Identification of aminoglycoside phosphotransferases of clinical bacterial isolates in the microbiota of Russians

Kovtun AS, Alekseeva MG, Averina OV, Danilenko VN

МНЕНИЕ

20

Серин-треониновые протеинкиназы бактерий — потенциальная мишень для регуляции состава микробиоты человека

Н. В. Захаревич, В. Н. Даниленко

Serine/threonine protein kinases of bacteria are potential targets for regulation of human microbiota composition

Zakharevich NV, Danilenko VN

МЕТОД

30

Особенности подготовки библиотек для метагеномного секвенирования образцов на платформе Illumina

А. Ю. Красненко, А. Ю. Елисеев, Д. И. Борисевич, К. Ю. Цуканов, А. И. Давыдова, В. В. Ильинский¹

Metagenomic library preparation for Illumina platform

Krasnenko AYU, Eliseev AYU, Borisevich DI, Tsukanov KYU, Davydova AI, Ilinsky VV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

37

Сравнительный анализ биотопы эякулята и цервикального канала методом ПЦР-РВ с тестами «Андрофлор» и «Фемофлор» в супружеских парах

Д. Г. Почерников, И. С. Галкина, Н. Т. Постовойтенко, А. М. Герасимов

A comparative analysis of seminal and vaginal microbiota of married couples by real-time PCR with Androflor and Femoflor reagent kits

Pochernikov DG, Galkina IS, Postovoytenko NT, Gerasimov AM

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

42

Нормальное состояние микробиоценоза влагалища: оценка с субъективной, экспертной и лабораторной точек зрения

Е. С. Ворошилаина, Д. Л. Зорников, Е. Э. Плотко

Normal vaginal microbiota: patient's subjective evaluation, physical examination and laboratory tests

Voroshilina ES, Zornikov DL, Plotko EE

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

47

Преобладание *Lactobacillus iners* в микробиоценозе влагалища женщин с умеренным дисбиозом ассоциировано с наличием клинических признаков инфекционно-воспалительной патологии влагалища
Е. С. Ворошилина, Е. Э. Плотко, Л. В. Хаютин, Н. А. Тищенко, Д. Л. Зорников

Prevalence of *Lactobacillus iners* in the vaginal microbiota of women with moderate dysbiosis is associated with clinical symptoms of infectious inflammatory condition of the vagina

Voroshilina ES, Plotko EE, Khayutin LV, Tischenko NA, Zornikov DL

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

52

Эффективность и безопасность применения отечественного цеpegинтерферона альфа-2b в терапии хронического гепатита С. Опыт реальной клинической практики

С. В. Ткачева, Э. Р. Манапова, Ю. М. Созинова, Ф. М. Якупова, Ю.В. Фазылова

Effectiveness and safety of treatment with domestic cepeginterferon alpha-2b in patients with chronic hepatitis C infection. Actual clinical experience

Tkacheva SV, Manapova ER, Sozinova YuM, Yakupova FM, Fazylova YuV

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

57

ИАГ-лазерная пункция при премакулярном кровоизлиянии на обоих глазах у пациента с острым миелобластным лейкозом

И. А. Малов, Н. В. Стрнев, Х. П. Тахчиди

Ng:YAG laser hyaloidotomy for premacular hemorrhage in both eyes in a patient with acute myeloblastic leukemia

Malov IA, Strennev NV, Takhchidi KhP

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

61

Возможна ли биолюминесценция у растений?

Е. Б. Гугля, А. А. Котлобай, Е. К Секретова, П. В. Волкова, И. В. Ямпольский

Bioluminescence: is it possible for a plant?

Guglya EB, Kotlobay AA, Sekretova E, Volkova PV, Yampolsky IV

МИКРОБИОМ ЧЕЛОВЕКА

А. В. Чаплин¹✉, Д. В. Ребриков^{2,3}, М. Н. Болдырева⁴

¹Кафедра микробиологии и вирусологии, педиатрический факультет, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

²НИИ трансляционной медицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

³Лаборатория клеточных технологий, Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова, Москва

⁴Отдел научных разработок, ООО «НПФ ДНК-Технология», Москва

Симбиотическая микрофлора играет огромную роль в обеспечении здорового состояния нашего организма. Она защищает от патогенов, поддерживает иммунитет, обеспечивает производство важных компонентов питания. Микробиота человека включает, по всей видимости, несколько тысяч видов грибов, эубактерий, архей и вирусов. Суммарное количество клеток только эубактерий в составе микробиоты превышает десять триллионов, что в сто раз больше числа собственных клеток организма человека. С появлением методов высокопроизводительного секвенирования исследователи получили возможность очень точной и комплексной оценки всего микробного сообщества с глубиной до тысячных долей процента (по содержанию микроба). Это позволило выйти на новый уровень понимания взаимосвязи здоровья человека и состояния его микробиома. В данном обзоре представлено современное состояние исследования ключевых микробных биоценозов человека — пищеварительного и урогенитального трактов. Менее изученные биоценозы носа и носоглотки, слухового канала, глаз, кожи и ряд других в обзор не вошли.

Ключевые слова: микробный биоценоз, микрофлора кишечника, урогенитальный, пародонтальный, метагеном, высокопроизводительное секвенирование

✉ **Для корреспонденции:** Чаплин Андрей Викторович
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; okolomedik@gmail.com

Статья получена: 16.04.2017 **Статья принята к печати:** 22.04.2017

THE HUMAN MICROBIOME

Chaplin AV¹✉, Rebrikov DV^{2,3}, Boldyreva MN⁴

¹Department of Microbiology and Virology, Pediatric Faculty, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

²Institute of Translational Medicine, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³Laboratory for Cell Technologies, Kulakov Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

⁴Research and Development Department, DNA-Technology LLC, Moscow, Russia

The symbiotic relationship with the microbial flora inhabiting our bodies plays an immense role in maintaining our vitality. The microbiota protects us from pathogens, hardwires our immunity, and engages in the production of essential micronutrient components. The human microbiota encompasses several thousands of fungi, eubacteria, archaea and viruses, with eubacterial cells alone totaling over 10 trillion and outnumbering our body cells 100 to 1. Next generation sequencing has allowed researchers to comprehensively assess the diversity of microbial species in the human microbiota and to estimate their proportions with stunning accuracy. This has led to a breakthrough in our understanding of associations between human health and the microbiota. This review focuses on the current state of research on key microbial communities inhabiting the human body: those of the gastrointestinal and genitourinary systems. Less studied microbial communities colonizing the nose, nasopharynx, auditory canal, eye, and skin, as well as some others, are not included in the review.

Keywords: microbial community, gut flora, genitourinary, periodontal, metagenome, next generation sequencing

✉ **Correspondence should be addressed:** Andrey Chaplin
ul. Ostrovityanova 1, Moscow, Russia, 117997; okolomedik@gmail.com

Received: 16.04.2017 **Accepted:** 22.04.2017

Микробиом кишечника

Микробиом кишечника человека является одним из наиболее активно исследуемых микробных сообществ. Это связано с невероятной сложностью его состава и изобилием его взаимодействий с организмом человека. Все чаще формулируются гипотезы о вовлеченности кишечной

микробиоты в патогенез различных заболеваний, чему с каждым годом появляется все больше подтверждений.

Формирование микробиома кишечного тракта человека — многоэтапный процесс. Становление микробиоты начинается еще *in utero* за счет бактерий, проникающих из кишечника, ротовой полости и вагинальной микробиоты матери [1]. Затем ребенок получает микроорганизмы

при прохождении через родовые пути [1], а также с грудным молоком, которое нестерильно и содержит значительные концентрации бактерий родов *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Propionibacterium* и *Bifidobacterium* [2]. Вскоре после рождения формируется типичный детский тип микробиоты кишечника, характеризующийся высокими концентрациями представителей рода *Bifidobacterium* [3], что в значительной степени определяется содержащимся в человеческом молоке набором олигосахаридов. К двум годам относительная численность *Bifidobacterium* постепенно снижается и складывается окончательный вариант кишечной микробиоты [3]. У детей, рожденных с помощью кесарева сечения, в течение первых месяцев жизни наблюдаются отличия в представленности отдельных групп бактерий в составе микробиоты, что может быть связано с отсутствием контакта с вагинальной микробиотой, приемом антибиотиков матерью и более поздним прикладыванием к груди [3, 4].

В состав микробиома кишечника взрослых людей могут входить представители более 600 различных родов [5]. Около 90 % всей микробиоты суммарно составляют бактерии типов *Firmicutes* и *Bacteroidetes*, преимущественно представленные труднокультивируемыми облигатными анаэробами. В европейской популяции наиболее часто встречающимися и многочисленными представителями *Firmicutes* являются *Faecalibacterium prausnitzii* и бактерии родов *Blautia*, *Dorea*, *Roseburia* и *Coprococcus*, к основным представителям кишечных *Bacteroidetes* относятся бактерии родов *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Prevotella*, *Odoribacter*, *Barnesiella* и *Alistipes* [5, 6]. Единичные проценты в кишечной микробиоте взрослых людей составляют бактерии типов *Actinobacteria* и *Proteobacteria* [5, 7], еще меньшую часть — *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia*, а также метаногенные археи типа *Euryarchaeota* [5, 8].

Концентрации отдельных представителей в кишечной микробиоте не являются независимыми друг от друга — они связаны сложной сетью симбиотических и антагонистических взаимодействий. В результате пространство всех возможных составов микробиоценоза кишечника не заполнено равномерно — можно выделить устойчивые комбинации соотношений микроорганизмов (энтеротипы), которые встречаются чаще, чем переходные формы между этими комбинациями. Исследователи выделяют три основных энтеротипа, характеризующиеся высокими концентрациями *Bacteroides*, *Prevotella* и *Ruminococcaceae* соответственно [5, 9]. Однако такое деление не описывает все разнообразие качественных и количественных характеристик кишечного микробиоценоза. Было показано влияние на состав микробиоты таких факторов, как потребляемая пища, курение, возраст, индекс массы тела, концентрации гемоглобина и эритроцитов в крови, прием антибиотиков [5]. Выраженными также являются межпопуляционные различия, предположительно, связанные с характером питания [7, 8]. Таким образом, несмотря на активное использование в литературе термина «дисбиоз» как звена патогенеза различных заболеваний, понятие «нормального» состава микробиоты кишечника человека до сих пор однозначно не определено.

Микробиом кишечника человека производит множество различных веществ, способных проникать в кровоток и оказывать действие на отдаленные органы и системы. Микробиом даже называют «виртуальным эндокринным органом» [10, 11]. Например, бактерии кишечной микробиоты способны секретировать в кровь такие сигнальные вещества, как серотонин, гамма-аминомасляная кислота,

гистамин, ацетилхолин, дофамин и норадреналин [11]. Важную роль в регуляции активности иммунной системы играют синтезируемые микроорганизмами лиганды рецепторов врожденного и адаптивного иммунитета: флагеллин, формилметионинсодержащие пептиды, липополисахарид, а также капсульные полисахариды, такие как полисахарид A *Bacteroides fragilis* [12].

Значительное внимание привлекают короткоцепочечные жирные кислоты — конечные продукты катаболизма углеводов, осуществляемого микроорганизмами в анаэробных условиях кишечника. Основными представителями данной группы веществ являются уксусная, пропионовая и масляная кислоты, производимые в молярном соотношении около 3 : 1 : 1 [11, 13]. Они быстро и эффективно всасываются в кишечнике, теряя с испражнениями лишь 5–10 % [13].

Короткоцепочечные жирные кислоты осуществляют биологическую активность через множество механизмов. Во-первых, они могут использоваться клетками человека в качестве источников энергии в процессе окислительного фосфорилирования. В частности, масляная кислота может обеспечивать 60–70 % энергетических потребностей колоноцитов [13]. Во-вторых, короткоцепочечные жирные кислоты осуществляют ингибирование деацетилаз гистонов, что оказывает противовоспалительный эффект: в результате их действия снижается уровень транскрипции, осуществляемой с помощью факторов семейства NF-κB, уменьшается уровень производимого фактора некроза опухоли-α и происходит индукция созревания FoxP3⁺ T_{reg}-клеток [12]. В-третьих, данные вещества являются специфичными лигандами ряда ассоциированных с G-белками рецепторов — GPR41, GPR43 и GPR109A [12, 13]. Через эти рецепторы осуществляется регуляция созревания и функционирования микроглии, дендритных клеток и T_{reg}-клеток [12].

Действие короткоцепочечных жирных кислот не ограничивается влиянием на функционирование иммунной системы. Так, они вызывают пролиферацию интестинальных бокаловидных клеток и увеличивают продукцию муцина [12]. Являясь субстратами для глюконеогенеза и липогенеза, они участвуют в регуляции углеводного и липидного метаболизма в клетках печени [13]. Отмечена способность короткоцепочечных жирных кислот снижать аппетит, стимулируя секрецию лептина адипоцитами, а также вызывая продукцию пептида YY и глюкагоноподобного пептида-1 L-клетками гастроэнтеропанкреатической эндокринной системы [13]. Вне всякого сомнения, воздействие на организм через короткоцепочечные жирные кислоты является одной из важнейших функций кишечного микробиома.

Еще одной важной ролью микробиоты кишечника является формирование колонизационной резистентности, предотвращающей заселение кишечника патогенными микроорганизмами, например, за счет конкуренции за питательные вещества [14]. Определенную роль могут играть и производимые микроорганизмами специфические антимикробные белки и пептиды — бактериоцины [15]. Антимикробным действием обладают вторичные желчные кислоты, образующиеся в результате дегидроксилирования первичных желчных кислот различными представителями нормальной микробиоты, такими как *Clostridium scindens* [16].

Среди всех заболеваний человека наиболее отчетливо связана с нарушением состава микробиома кишечника *Clostridium difficile*-ассоциированная болезнь. Клиническая картина данного заболевания может варьировать от

легкой диареи до синдрома системной воспалительной реакции со смертельным исходом [17]. *Clostridium difficile* часто присутствует в составе нормальной микробиоты, но запуск активного размножения патогена, продукция токсинов, гликозилирующих ГТФазы Rho, и последующая манифестация клинической симптоматики провоцируется нарушением колонизационной резистентности, вызванной приемом антибиотиков широкого спектра действия [16,17]. Есть свидетельства, что употребляемые перорально живые пробиотические штаммы микроорганизмов могут быть эффективны для профилактики *Clostridium difficile*-ассоциированной болезни у детей и взрослых [18]. Одним из наиболее перспективных подходов лечения данного заболевания на сегодняшний день является метод фекальной микробной трансплантации, при котором суспензия из микроорганизмов нормальной микробиоты от здорового донора вводится в кишечник через клизму, колоноскоп, назогастральный или назодуоденальный зонд [19]. Планируется также создание банков кишечной микробиоты, которые можно использовать для «аутологичной» фекалотрансплантации в случае необходимости (рис. 1). Данный подход лишен основного недостатка пробиотических препаратов, позволяя переносить целое микробное сообщество, содержащее в том числе труднокультивируемые микроорганизмы.

Наиболее опасным заболеванием, характерным для недоношенных детей, является некротизирующий энтероколит — остропротекающее воспалительное заболевание кишечника, которое может осложняться некрозом кишечной стенки с развитием перфорации и разлитого перитонита. Последние исследования показывают, что в основе некротизирующего энтероколита лежит аномальный ответ незрелой системы врожденного иммунитета на микробную колонизацию кишечника [21]. В частности, такой ответ может быть следствием взаимодействия гиперэкспрессирующихся Toll-like рецепторов 4 с липополисахаридом клеточной стенки грамотрицательных бактерий [21]. Многочисленные исследования показывают, что у детей до на-

чала некротизирующего энтероколита можно обнаружить измененный состав микробиоты, для которого характерно повышение относительной концентрации *Proteobacteria* и снижение концентраций *Firmicutes* и *Bacteroidetes* [22]. Есть значительные основания полагать, что прием некоторых пробиотических препаратов может снижать частоту развития тяжелых форм некротизирующего энтероколита и уменьшать смертность [21, 23].

Отдельные представители кишечной микробиоты принимают участие в патогенезе колоректального рака и часто обнаруживаются в соответствующих опухолевых тканях [24]. Так, *Fusobacterium nucleatum* может способствовать прогрессии опухоли с вовлечением различных прямых и опосредованных через воспалительную реакцию механизмов. В частности, взаимодействие адгезина FadA данных бактерий с поверхностным белком E-кадгерином запускает каскад β -катенин-зависимых онкогенных и провоспалительных сигналов [24]. Онкогенными также могут являться отдельные штаммы *Escherichia coli*, продуцирующие генотоксичные факторы патогенности, такие как низкомолекулярное вещество колибактин и белковый токсин CDT [24, 25].

Появляется все больше доказательств вовлеченности микробиоты кишечника в патогенез многих других заболеваний, например, сахарного диабета 1-го типа [26], ожирения [27] и расстройств аутистического спектра [28]. Без сомнения, в скором времени станет доступно больше информации о роли интестинального микробиома в поддержании здоровья человека.

Микробиом ротовой полости и пародонта

Полость рта — одно из наиболее густонаселенных мест человеческого организма, содержащее более 1000 разных видов эубактерий, архей, грибов и вирусов. Состояние ротовой микробиоты напрямую связано с широким спектром заболеваний человека, таких как болезни полости

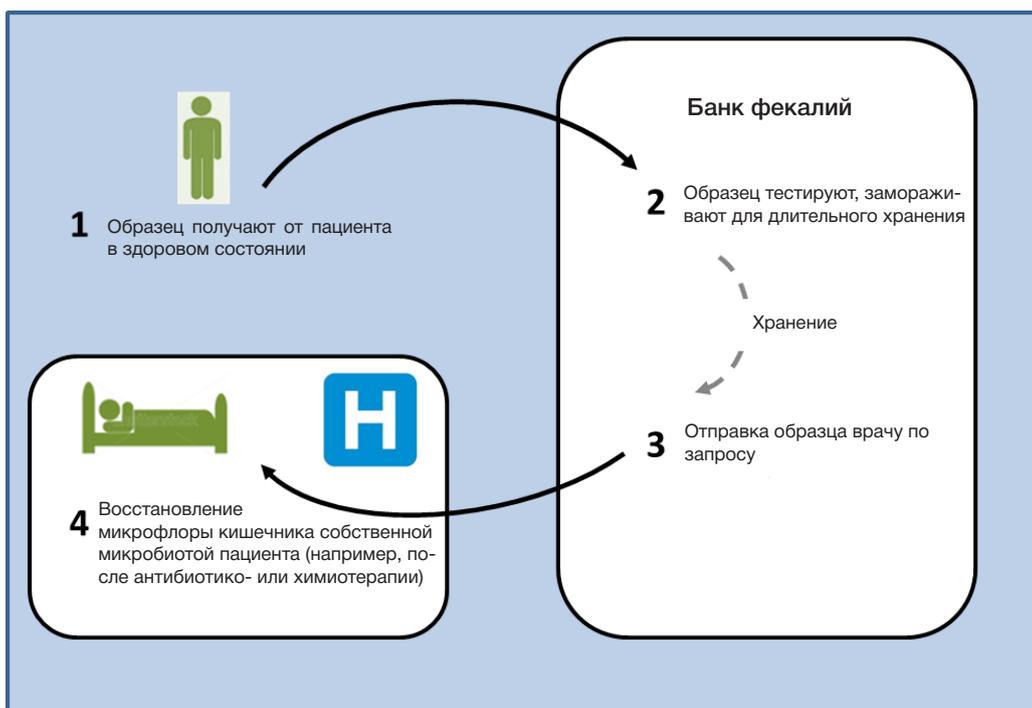


Рис. 1. Использование банка «аутологичной» нормальной микробиоты в составе фекалий (Olle, [20])

рта (кариес и заболевания пародонта), сахарный диабет, заболевания сердечно-сосудистой системы, онкологические заболевания и другие. Установлено, что влияние микробиома ротовой полости на развитие заболеваний является комплексным: решающую роль играет не наличие какого-то конкретного микроорганизма, а их сочетание.

В полости рта, как правило, исследуют несколько стандартных типов биологического материала, отражающих состояние того или иного микробного сообщества: слюна, мягкий зубной налет, поддесневой и наддесневой зубной камень, содержимое пародонтального кармана. Причем все эти биотопы, за исключением биоценоза пародонтального кармана, являются крайне нестабильными и существенно зависят от интенсивности и типа гигиены ротовой полости. Так, исследования консорциума мягкого зубного налета при помощи высокопроизводительного секвенирования дают следующую вариативность состава основных представителей: 1,0–13,5 % *Actinobacteria*, 21,4–63,5 % *Bacteroidetes*, 14,6–30,8 % *Firmicutes*, 4,7–12,1 % *Fusobacteria*, 2,6–22,9 % *Proteobacteria*, 0,04–12,9 % *Spirochaetes*, 0,0004–0,84 % *Synergistetes* [29].

Одной из наиболее устойчивых экологических ниш ротовой полости является микробиота пародонтального кармана. Она достаточно изолирована от внешней среды и практически не подвергается воздействию в ходе гигиенических процедур (рис. 2).

Множество работ указывают на взаимосвязь состава микробиоты пародонтального кармана с развитием кариеса и пародонтита [30, 31]. В ряде исследований показана связь состояния микробиоты пародонта и нижележащих отделов пищеварительной системы [32, 33]. Обнаружена взаимосвязь состава микробиоты пародонтального кармана с полом пациента. Так, гиперколонизация *Porphyromonas gingivalis* в тканях пародонта коррелирует с тяжестью хронического пародонтита у женщин, но не у мужчин. *Tannerella forsythensis* или ее комплекс в сочетании с *Treponema denticola*, напротив — единственный пародонтоген, чье преобладание статистически связано с хроническим пародонтитом у мужчин [34].

В работе Зориной и соавт. [35] проанализирована представленность видов и родов бактерий в микрофлоре пародонта пациентов с агрессивным пародонтитом и лиц со здоровым пародонтом. В исследовании выявлено 6 родов потенциальных пародонтопротекторов и 8 родов потенциальных пародонтопатогенов, имеющих отношение к риску возникновения агрессивного (но не хронического) пародонтита.



Рис. 2. Забор содержимого пародонтального кармана [фото предоставлено Н. К. Аймадиновой, ЦНИИСИЧЛХ, Москва, Россия]

донтита. Показано статистически достоверное повышение представленности родов *Porphyromonas*, *Treponema*, *Synergistes*, *Tannerella*, *Filifactor*, *Ruminococcus*, *Parvimonas*, *Mycoplasma*, из которых три (*Porphyromonas*, *Treponema* и *Tannerella*) традиционно рассматриваются как пародонтопатогены. В контрольной группе было впервые выявлено статистически достоверное доминирование рода *Veillonella*, которое может служить критерием здоровья пародонта. Роды *Streptococcus*, *Bergeyella*, *Granulicatella*, *Kingella* и *Corynebacterium* авторы предлагают рассматривать в качестве кандидатных пародонтопротекторов [35].

Микробиом репродуктивной системы

Давно известно, что в женском репродуктивном тракте микробиом может быть очень разнообразным. Наибольшее внимание исследователи уделяли влагалищному биотопу, хотя в последние десятилетия накоплены данные, свидетельствующие, что остальная часть женской репродуктивной системы также не является стерильной, включая и полость матки [36]. Возникает понимание того, что микробиом простирается выше полости эндометрия. В некоторых исследованиях бактерии были обнаружены в фаллопиевых трубах женщин без очевидной трубной патологии.

Изучение связи микробиома репродуктивной системы с эффективностью зачатия и развитием беременности только начинается. Установлена связь между клинически выраженной инфекцией, воспалением и нарушением репродуктивной функции. Воспаление включает секрецию ряда провоспалительных цитокинов и факторов роста, секретируемых иммунными клетками, которые активируются в ответ на присутствие инфекционных патогенов. Даже небольшие изменения в микробиоме вызывают изменения в окружающих тканях, которые обычно клинически не очевидны, но могут быть клинически значимы [37].

В нормальном микробиоме влагалища обычно доминируют лактобациллы [38], действующие как пробиотики и ингибирующие размножение других видов бактерий. Считается, что наиболее благоприятными являются виды *Lactobacilli*, способные продуцировать высокие уровни H_2O_2 . Этот факт позволяет понять, что прямое взаимодействие микроорганизмов с окружающими тканями возможно, но не является обязательным, и что основная функция одних компонентов микробиома может состоять в изменении или ограничении каких-либо других его компонентов.

Микробиом репродуктивной системы — это не просто скопление свободно плавающих бактерий. Во многих случаях формируются сложные трехмерные решетки, которые могут быть многослойными, могут образовывать защитное внешнее покрытие, состоящее из полисахарида, нуклеиновой кислоты и белка. Иногда эти биопленки препятствуют обнаружению микроорганизмов иммунной системой и снижают эффективность антимикробного лечения [39].

Биопленки обычно присутствуют во влагалище, но также могут распространяться в полость эндометрия [39] и даже выше, в фаллопиевы трубы. Хотя никаких окончательных выводов относительно роли биопленок в развитии репродуктивных нарушений не сделано, важно понять, что взаимосвязь между микробиомом и системой репродукции может быть более сложной, чем простое присутствие или отсутствие различных видов бактерий или даже их относительное количество.

Микробиом может влиять на гаметогенез. Было обнаружено, что некоторые бактерии могут неблагоприятно влиять на развитие фолликулов и даже подавлять реакцию на гонадотропин [36]. Аналогичным образом некоторые бактерии оказывают неблагоприятное воздействие на мужскую репродуктивную систему, причем незначительные изменения в микробиоме могут влиять на параметры спермы. К настоящему времени показано, что микробиом мужской репродуктивной системы является более сложным, чем считалось ранее. По мере того как увеличивается объем знаний о микробиоме женской и мужской репродуктивных систем, появляются новые возможности целенаправленного терапевтического воздействия.

Вагинальный микробиом

Исследование физиологического состояния микробиома влагалища было выполнено в рамках проекта «Микробиом человека» [38]. На примере 113 здоровых женщин-добровольцев была дана микробная характеристика трех биотопов влагалища: входа во влагалище, средней части и заднего свода. Образцы подвергали анализу гена 16S рРНК посредством пиросеквенирования. Исследование позволило охарактеризовать альфа-разнообразие (у одного и того же человека) и бета-разнообразие (между разными людьми) микроорганизмов влагалища и дало неожиданные результаты. Было установлено, что репродуктивный тракт характеризуется самым низким альфа- и очень низким бета-разнообразием микроорганизмов по филотипам бактерий по сравнению с другими участками тела, такими как, например, рот или кожа [38]. Кроме того, вариации между видами бактерий в образцах, взятых из разных отделов влагалища, были невелики, а виды *Lactobacillus* доминировали. В динамике различия между образцами от одного человека были меньше, чем между разными людьми, что указывает на высокую стабильность микробиома во времени. Тот факт, что вагинальные микробные сообщества у здоровых женщин относительно просты по сравнению с другими участками тела, означает, что характеристика состояния здоровья и болезни может быть связана с четко определенными сдвигами в микробиоме [39].

В отличие от проекта «Микробиом человека», в котором принимали участие здоровые женщины, в других исследованиях изучали связь между вагинальным микробиомом и женским бесплодием. В одной из таких работ проспективно культуральным методом были проанализированы 152 пациентки, которым провели экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО) [40]. У 133 (87,5 %) женщин получили культуры одного или нескольких микроорганизмов, у 19 (12,5 %) — культуры получены не были. Наиболее часто выявляли *Lactobacillus spp.*, *Staphylococcus spp.* и *Enterobacteriaceae*, включая *E. coli*, *Klebsiella* и *Proteus*. В результате успешная частота имплантации составила 12,4 % у пациенток с одной или несколькими бактериальными культурами против 14 % у женщин с полностью отрицательной культурой ($p < 0,001$). Кроме того, у пациенток с положительной культурой *Enterobacteriaceae* и *Staphylococcus* отмечены более низкие показатели наступления беременности, чем в группе с отрицательной культурой. Хотя это исследование дает некоторое представление о микробиоме в ходе лечения ЭКО, в нем подчеркиваются ограничения, связанные с культуральными исследованиями для оценки микробиома. Тот факт, что 12,5 % пациенток были полностью отрицательны по бак-

териальной контаминации, свидетельствует, что в методе, основанном на выделении культуры, существенно недооценивается наличие и разнообразие микробиома во время переноса эмбрионов при вспомогательных репродуктивных технологиях.

Исследование с использованием технологии секвенирования 16S рНК позволило получить данные о вагинальном микробиоме у бесплодной пациентки, подвергшейся ЭКО [40]. В итоге было показано, что меньшее разнообразие бактерий связано с более высокой вероятностью рождения живого ребенка. В настоящее время предложены эффективные молекулярно-биологические методы исследования [41] и получены объективные данные о различных характеристиках вагинального микробиома при разных клинических состояниях [42, 43], однако исследования влагалищного микробиома продолжаются.

Микробиом матки

До недавнего времени полагали, что колонизация верхних отделов половых путей микробами обусловлена исключительно патологическим восхождением микроорганизмов из влагалища через канал шейки матки. Из-за барьерного эффекта цервикальной слизи с высокой концентрацией провоспалительных цитокинов, иммуноглобулинов и наличием антимикробных пептидов полость матки у здоровых женщин считали стерильной [44–48]. Однако в репродуктивном тракте существует восходящий транспорт. Действительно, когда 1–2 мл радиоактивно меченых макроагрегатов человеческого сывороточного альбумина размером со сперматозоиды человека помещали в задний вагинальный свод, в матке их обнаруживали уже через 2 мин [49].

Более ранние исследования микробиома матки выполнялись с использованием культуральной технологии, поэтому они были подвержены ограничениям, описанным выше в разделе «Вагинальный микробиом». В недавнем исследовании у 58 женщин, подвергшихся гистерэктомии, методом количественной ПЦР оценивали 12 конкретных видов бактерий [50]. Перед гистерэктомией проводили отбор вагинальных проб, после гистерэктомии выполняли отбор проб из полости матки. Колонизация верхних отделов половых путей по крайней мере одним видом бактерий была подтверждена в 95 % случаев. Наиболее часто выявляли *Lactobacillus* и *Prevotella*. Следует отметить, что среднее количество бактерий в верхних отделах половых путей было ниже, чем влагалищных, на $2-4 \log_{10}$ рНК-копий генов на мазок. Эти данные свидетельствуют о том, что либо шейка матки действует как частичный фильтр для восходящих микроорганизмов, либо иммунная система уменьшает восходящую бактериальную нагрузку, либо имеется сочетание этих двух механизмов.

Микробиом фолликулов яичника

Человеческие фолликулярные жидкости широко культивируются и, как установлено, у многих пациентов имеют микробиом. Хотя некоторые образцы были собраны из фолликулярного аспирата, полученного во время трансвагинального извлечения ооцита, другие были собраны лапароскопически [51–54]. Неясно, представляют ли полученные культуры бактерий истинную колонизацию или являются загрязнением фолликулярной жидкости яичника во время пункции при трансвагинальной аспирации ооцитов [52, 54]. Некоторые авторы полагают, что

микроорганизмы можно считать колонизирующими или загрязняющими на основании сравнения состава бактерий, присутствующих в образце, с составом бактерий, обнаруженных на поверхности пункционной иглы [54, 55], и если в фолликуле найдены уникальные виды, то их следует считать колонизирующими. Такое определение, однако, не учитывает случаи, когда потенциальный патоген поднимается из влагалища в верхние половые пути и также реализует истинную колонизацию. В фолликулярной жидкости были обнаружены микроорганизмы, являющиеся представителями нормальной флоры влагалища (*Lactobacillus spp.*), желудочно-кишечного тракта (*Bifidobacterium spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus agalactiae*), кожи (*Staphylococcus spp.*) и слизистой оболочки полости рта (*Streptococcus spp.*), что подтверждает идею о том, что фолликулярная жидкость не всегда загрязнена в процессе извлечения ооцита, а может быть колонизирована независимо [56]. Исследования, одновременно оценивающие микробиом влагалища, эндоцервикса, эндометрия, фаллопиевых труб, фолликулярной жидкости и перитонеальной полости, отсутствуют.

Микробиом репродуктивного тракта у мужчин

Информация о составе нормальной уретральной флоры у мужчин очень ограничена и получена на маленьких выборках. Так, в группе из 33 мужчин без уретрита культивационными методами были выявлены *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium spp.*, *Lactobacilli*, *Haemophilus vaginalis*, *alpha-hemolytic streptococci* [57]. В 9 образцах первой порции мочи мужчин без клиники уретрита и с отсутствием инфекций, передаваемых половым путем, методом секвенирования 16S рПНК самыми частыми были определены *Corynebacterium*, *Lactobacilli* и *Streptococci* [58]. В образцах из венечной борозды у необрезанных мужчин, партнеров женщин без бактериального вагиноза, некультивационными методами были выявлены *Corynebacterium*, *Lactobacillus* и *Staphylococcus* [59]. Таким образом, в отличие от женщин репродуктивного возраста, у которых доминирующей группой бактерий в норме являются представители рода *Lactobacillus* [60], у мужчин в уретральном биотопе в норме нет какого-либо одного доминирующего микроорганизма, а бактериальные сообщества нормального микробиома являются сложными [58].

Исследования по оценке микробиома семенной жидкости до настоящего времени проводили в основном с использованием традиционной культуральной технологии. Были выявлены связи между острым, хроническим простатитом и различными инфекциями, включая гонорею и хламидиоз. Совсем недавно для характеристики семенных микробиомов и классического анализа спермы у мужчин в качестве инструмента начали использовать метагеномику. Ноу и соавт. оценили 77 образцов, полученных от 58 бесплодных пациентов и 19 здоровых доноров спермы [61]. Результаты показали, что параметры спермы от различных пациентов, сгруппированных в шесть групп на основе сходства состава микробиома и разнообразия таксонов, были эквивалентны. Таким образом, проведенное группирование не было связано с характеристиками спермы. Дальнейшая оценка отдельных таксонов показала, что только *Anaerococcus* был значительно связан с измененными параметрами спермы. Недавно Weng и соавт. выполнили похожее исследование на 96 образцах [62], у 60 из которых была одна или несколько аномалий в параметрах спермы, оцененных классическим анализом. Остальные 36 образцов имели нормальные характеристики и служили в этом исследовании контрольной группой. Доминирующими таксонами среди выявленных групп микроорганизмов были *Pseudomonas*, *Lactobacillus* или *Prevotella*. Наиболее интересной оказалась выраженная связь между этими группами и клиническими характеристиками сперматозоидов в этих группах. В группе, где доминировала *Lactobacillus*, была очень высокая пропорция нормальных сперматозоидов. Это свидетельствует о том, что, как и в женском репродуктивном тракте, некоторые виды *Lactobacillus* у мужчин могут действовать как пробиотики, обеспечивая защиту от других, более вредных бактерий.

Выполненные исследования не носят окончательного характера и вызывают больше вопросов, чем дают ответов. Они показывают связь между клиническими данными и различной микробиотой. Неизвестно, что наносит вред сперматозоидам — измененный микробиом, создающий среду, или, наоборот, различия в семенном содержимом могут создать среду, в которой живут разные типы бактерий. Тем не менее эти первые шаги критически важны, и необходимо собирать больше данных. Некоторые авторы указали, что подобные исследования продолжатся в настоящее время.

Литература

1. Stinson LF, Payne MS, Keelan JA. Planting the seed: Origins, composition, and postnatal health significance of the fetal gastrointestinal microbiota. *Crit Rev Microbiol*. 2017 May; 43 (3): 352–69.
2. Fitzstevens JL, Smith KC, Hagadorn JI, Caimano MJ, Matson AP, Brownell EA. Systematic Review of the Human Milk Microbiota. *Nutr Clin Pract*. 2016 Sep 27. pii: 0884533616670150. PubMed PMID: 27679525.
3. Jakobsson HE, Abrahamsson TR, Jenmalm MC, Harris K, Quince C, Jernberg C, et al. Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by Caesarean section. *Gut*. 2014 Apr; 63 (4): 559–66.
4. Rutayisire E, Huang K, Liu Y, Tao F. The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: a systematic review. *BMC Gastroenterol*. 2016 Jul 30; 16 (1): 86.
5. Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, Wang J, Darzi Y, Faust K, et al. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science*. 2016 Apr 29; 352 (6285): 560–4.
6. Kulagina EV, Efimov BA, Maximov PY, Kafarskaia LI, Chaplin AV, Shkoporov AN. Species Composition of Bacteroidales Order Bacteria in the Feces of Healthy People of Various Ages. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2012; 76 (1): 169–71.
7. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Aug 17; 107 (33): 14691–6.
8. Tyakht AV, Kostyukova ES, Popenko AS, Belenikin MS, Pavlenko AV, Larin AK, et al. Human gut microbiota community structures in urban and rural populations in Russia. *Nat Commun*. 2013; 4: 2469.
9. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011 May 12; 473 (7346): 174–80.
10. Evans JM, Morris LS, Marchesi JR. The gut microbiome: the role

- of a virtual organ in the endocrinology of the host. *J Endocrinol*. 2013 Aug 28; 218 (3): R37–47.
11. Clarke G, Stilling RM, Kennedy PJ, Stanton C, Cryan JF, Dinan TG. Minireview: Gut Microbiota: The Neglected Endocrine Organ. *Mol Endocrinol*. 2014 Aug; 28 (8): 1221–38.
 12. Rooks MG, Garrett WS. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat Rev Immunol*. 2016 May 27; 16 (6): 341–52.
 13. Canfora EE, Jocken JW, Blaak EE. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nat Rev Endocrinol*. 2015 Oct; 11 (10): 577–91.
 14. Kamada N, Kim Y-G, Sham HP, Vallance BA, Puente JL, Martens EC, et al. Regulated virulence controls the ability of a pathogen to compete with the gut microbiota. *Science*. 2012 Jun 8; 336 (6086): 1325–9.
 15. Dobson A, Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocin production: a probiotic trait? *Appl Environ Microbiol*. 2012 Jan; 78 (1): 1–6.
 16. Buffie CG, Bucci V, Stein RR, McKenney PT, Ling L, Gobourne A, et al. Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile*. *Nature*. 2015 Jan 8; 517 (7533): 205–8.
 17. Ивашкин В. Т., Шифрин О. С., Тертычный А. С., Полуэктова Е. А., Лапина Т. Л., Ляшенко О.С. и др. *Clostridium difficile*-ассоциированная болезнь. *Рос. журн. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол*. 2016; 25 (6): 5–17.
 18. Goldenberg JZ, Ma SS, Saxton JD, Martzen MR, Vandvik PO, Thorlund K, et al. Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013 May 31; (5): CD006095.
 19. Cammarota G, Ianiro G, Gasbarrini A. Fecal Microbiota Transplantation for the Treatment of *Clostridium difficile* Infection: a Systematic Review. *J Clin Gastroenterol*. 2014 Sep; 48 (8): 693–702.
 20. Olle B. Who Will Figure Out How to Make a Business Out of Fecal Transplants? [Internet]. 2013 May 3 [cited 2017 Apr 3]; [about 7 p.]. Available from: <http://www.fiercebiotech.com/r-d/who-will-figure-out-how-to-make-a-business-out-of-fecal-transplants>
 21. Hodzic Z, Bolock AM, Good M. The Role of Mucosal Immunity in the Pathogenesis of Necrotizing Enterocolitis. *Front Pediatr*. 2017 Mar 3; 5: 40.
 22. Pammi M, Cope J, Tarr PI, Warner BB, Morrow AL, Mai V, et al. Intestinal dysbiosis in preterm infants preceding necrotizing enterocolitis: a systematic review and meta-analysis. *Microbiome*. 2017 Mar 9; 5 (1): 31.
 23. AlFaleh K, Anabrees J. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014 Apr 10; (4): CD005496.
 24. Leung A, Tsoi H, Yu J. *Fusobacterium* and *Escherichia*: models of colorectal cancer driven by microbiota and the utility of microbiota in colorectal cancer screening. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015 May; 9 (5): 651–7.
 25. Graillot V, Dormoy I, Dupuy J, Shay JW, Huc L, Mirey G, et al. Genotoxicity of Cytolethal Distending Toxin (CDT) on Isogenic Human Colorectal Cell Lines: Potential Promoting Effects for Colorectal Carcinogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016 Mar 23; 6: 34.
 26. Needell JC, Zipris D. The Role of the Intestinal Microbiome in Type 1 Diabetes Pathogenesis. *Curr Diab Rep*. 2016 Oct; 16 (10): 89.
 27. Boulangé CL, Neves AL, Chilloux J, Nicholson JK, Dumas M-E. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome Med*. 2016 Apr 20; 8 (1): 42.
 28. Ding HT, Taur Y, Walkup JT. Gut Microbiota and Autism: Key Concepts and Findings. *J Autism Dev Disord*. 2017 Feb; 47 (2): 480–9.
 29. Jünemann S, Prior K, Szczepanowski R, Harks I, Ehmke B, Goesmann A, et al. Bacterial community shift in treated periodontitis patients revealed by ion torrent 16S rRNA gene amplicon sequencing. *PLoS One*. 2012; 7 (8): e41606.
 30. Зорина О. А., Кулаков А. А., Ребриков Д. В. Количественная оценка соотношения патогенных представителей микробиоценоза полости рта в норме и при пародонтите. *Стоматология*. 2011; 90 (3): 40–2.
 31. Yanushevich OO, Ayvazova RA, Shibaeva AV, Rebrikov DV, Trubnikova EV, Kudykina YK, et al. Quantitative PCR studies of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Treponema denticola*/Tanerella forsythensis Complex as Etiological Factors of Chronic Periodontitis. *Bull Exp Biol Med*. 2016 Feb; 160 (4): 495–7.
 32. Шибаева А. В., Айвазова Р. А., Ребриков Д. В., Трубникова Е. В., Кудыкина Ю. К., Белякова А. В. и др. Применение метода ПЦР в реальном времени для изучения микробиома пародонта у пациентов с сочетанной патологией гастроудоденальной зоны и хроническим пародонтитом. *Мол. ген., микробиол. и вирусол*. 2016; 34 (1): 26–30.
 33. Петрухина Н. Б., Зорина О. А., Ших Е. В., Шибаева А. В., Шевелев А. Б. Изучение взаимосвязи состава микробиома пародонта и кишечника в норме и при патологии методами глубокого секвенирования. *Стоматология*. 2016; 95 (2): 8–13.
 34. Зорина О. А., Аймадинова Н. К., Басова А. А., Шибаева А. В., Ребриков Д. В. Гендерные различия в микробиоме пародонтального кармана у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом. *Стоматология*. 2016; 95 (3): 10–6.
 35. Зорина О. А., Петрухина Н. Б., Басова А. А., Шибаева А. В., Трубникова Е. В., Шевелев А. Б. Идентификация ключевых элементов нормальной и патогенной микрофлоры, определяющей состояние пародонта, методом NGS-секвенирования банков 16S-рДНК бактериальных консорциумов пародонта. *Стоматология*. 2014; 93 (6): 25–31.
 36. Fransiak JM, Scott RT Jr. Reproductive tract microbiome in assisted reproductive technologies. *Fertil Steril*. 2015 Dec; 104 (6): 1364–71.
 37. Болдырева М. Н., Байрамова Г. Р., Бурменская О. В. Диагностические возможности метода ПЦР в режиме реального времени для оценки биоты и локального воспаления в тканях урогенитального тракта. *Справ. зав. КДЛ*. 2015; (1): 9–17.
 38. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012 Jun 13; 486 (7402): 207–14.
 39. Swidsinski A, Verstraelen H, Loening-Baucke V, Swidsinski S, Mendling W, Halwani Z. Presence of a polymicrobial endometrial biofilm in patients with bacterial vaginosis. *PLoS One*. 2013; 8 (1): e53997.
 40. Selman H, Mariani M, Barnocchi N, Mencacci A, Bistoni F, Arena S, et al. Examination of bacterial contamination at the time of embryo transfer, and its impact on the IVF/pregnancy outcome. *J Assist Reprod Genet*. 2007 Sep; 24 (9): 395–9.
 41. Шипицына Е. В., Мартикайнен З. М., Воробьева Н. Е., Ермошкина М. С., Степанова О. С., Донников А. Е. и др. Применение теста Фемофлор для оценки микробиоценоза влагалища. *Журн. акуш. и женск. бол*. 2009; 58 (3): 44–50.
 42. Болдырева М. Н., Липова Е. В., Алексеев Л. П., Витвицкая Ю. Г., Гуськова И. А. Характеристика биоты урогенитального тракта у женщин репродуктивного возраста методом ПЦР в реальном времени. *Журн. акуш. и женск. бол*. 2009; 58 (6): 36–42.
 43. Hyman RW, Herndon CN, Jiang H, Palm C, Fukushima M, Bernstein D, et al. The dynamics of the vaginal microbiome during infertility therapy with in vitro fertilization-embryo transfer. *J Assist Reprod Genet*. 2012 Feb; 29 (2): 105–15.
 44. Hein M, Petersen AC, Helmig RB, Uldbjerg N, Reinholdt J. Immunoglobulin levels and phagocytes in the cervical mucus plug at term of pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2005 Aug; 84 (8): 734–42.
 45. Ulcova-Gallova Z. Immunological and physicochemical properties of cervical ovulatory mucus. *J Reprod Immunol*. 2010 Nov; 86 (2): 115–21.
 46. Lieberman JA, Moscicki AB, Sumerel JL, Ma Y, Scott ME. Determination of cytokine protein levels in cervical mucus samples from young women by a multiplex immunoassay method and assessment of correlates. *Clin Vaccine Immunol*. 2008 Jan; 15 (1): 49–54.
 47. Ming L, Xiaoling P, Yan L, Lili W, Qi W, Xiyong Y, et al. Purification of antimicrobial factors from human cervical mucus. *Hum Reprod*. 2007 Jul; 22 (7): 1810–5.
 48. Ansbacher R, Boyson WA, Morris JA. Sterility of the uterine cavity. *Am J Obstet Gynecol*. 1967 Oct 1; 99 (3): 394–6.

49. Zervomanolakis I, Ott HW, Hadziomerovic D, Mattle V, Seeber BE, Virgolini I, et al. Physiology of upward transport in the human female genital tract. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Apr; 1101: 1–20.
50. Mitchell CM, Haick A, Nkwopara E, Garcia R, Rendi M, Agnew K, et al. Colonization of the upper genital tract by vaginal bacterial species in nonpregnant women. *Am J Obstet Gynecol.* 2015 May; 212 (5): 611. e1–9.
51. Artley JK, Braude PR, Cooper P. Vaginal squamous cells in follicular aspirates following transvaginal puncture. *Hum Reprod.* 1993 Aug; 8 (8): 1272–3.
52. Cottell E, McMorrow J, Lennon B, Fawcys M, Cafferkey M, Harrison RF. Microbial contamination in an in vitro fertilization-embryo transfer system. *Fertil Steril.* 1996 Nov; 66 (5): 776–80.
53. Saltes B, Molo MW, Binor Z, Radwanska E. Bacterial contamination after transvaginal aspiration (TVA) of oocytes. *J Assist Reprod Genet.* 1995 Oct; 12 (9): 657–8.
54. Pelzer ES, Allan JA, Cunningham K, Mengersen K, Allan JM, Launchbury T, et al. Microbial colonization of follicular fluid: alterations in cytokine expression and adverse assisted reproduction technology outcomes. *Hum Reprod.* 2011 Jul; 26 (7): 1799–812.
55. Spence MR, Blanco LJ, Patel J, Brockman MT. A comparative evaluation of vaginal, cervical and peritoneal flora in normal, healthy women: a preliminary report. *Sex Transm Dis.* 1982 Jan–Mar; 9 (1): 37–40.
56. Pelzer ES, Allan JA, Waterhouse MA, Ross T, Beagley KW, Knox CL. Microorganisms within Human Follicular Fluid: Effects on IVF. *PLoS One.* 2013; 8 (3): e59062.
57. Bowie WR, Pollock HM, Forsyth PS, Floyd JF, Alexander ER, Wang SP, et al. Bacteriology of the urethra in normal men and men with nongonococcal urethritis. *J Clin Microbiol.* 1977 Nov; 6 (5): 482–8.
58. Nelson DE, Van Der Pol B, Dong Q, Revanna KV, Fan B, Easwaran S, et al. Characteristic Male Urine Microbiomes Associate with Asymptomatic Sexually Transmitted Infection. *PLoS One.* 2010 Nov 24; 5 (11): e14116.
59. Liu CM, Hungate BA, Tobian AA, Ravel J, Prodder JL, Serwadda D, et al. Penile microbiota and female partner bacterial vaginosis in Rakai, Uganda. *MBio.* 2015 Jun 16; 6 (3): e00589–15.
60. Ma B, Forney LJ, Ravel J. Vaginal microbiome: rethinking health and disease. *Annu Rev Microbiol.* 2012; 66: 371–89.
61. Hou D, Zhou X, Zhong X, Settles ML, Herring J, Wang L, et al. Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men. *Fertil Steril.* 2013 Nov; 100 (5): 1261–9.
62. Weng SL, Chiu CM, Lin FM, Huang WC, Liang C, Yang T, et al. Bacterial communities in semen from men of infertile couples: metagenomic sequencing reveals relationships of seminal microbiota to semen quality. *PLoS One.* 2014 Oct 23; 9 (10): e110152.

References

1. Stinson LF, Payne MS, Keelan JA. Planting the seed: Origins, composition, and postnatal health significance of the fetal gastrointestinal microbiota. *Crit Rev Microbiol.* 2017 May; 43 (3): 352–69.
2. Fitzstevens JL, Smith KC, Hagadorn JI, Caimano MJ, Matson AP, Brownell EA. Systematic Review of the Human Milk Microbiota. *Nutr Clin Pract.* 2016 Sep 27. pii: 0884533616670150. PubMed PMID: 27679525.
3. Jakobsson HE, Abrahamsson TR, Jenmalm MC, Harris K, Quince C, Jernberg C, et al. Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by Caesarean section. *Gut.* 2014 Apr; 63 (4): 559–66.
4. Rutayisire E, Huang K, Liu Y, Tao F. The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: a systematic review. *BMC Gastroenterol.* 2016 Jul 30; 16 (1): 86.
5. Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, Wang J, Darzi Y, Faust K, et al. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science.* 2016 Apr 29; 352 (6285): 560–4.
6. Kulagina EV, Efimov BA, Maximov PY, Kafarskaia LI, Chaplin AV, Shkaporov AN. Species Composition of Bacteroidales Order Bacteria in the Feces of Healthy People of Various Ages. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2012; 76 (1): 169–71.
7. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Aug 17; 107 (33): 14691–6.
8. Tyakht AV, Kostyukova ES, Popenko AS, Belenikin MS, Pavlenko AV, Larin AK, et al. Human gut microbiota community structures in urban and rural populations in Russia. *Nat Commun.* 2013; 4: 2469.
9. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature.* 2011 May 12; 473 (7346): 174–80.
10. Evans JM, Morris LS, Marchesi JR. The gut microbiome: the role of a virtual organ in the endocrinology of the host. *J Endocrinol.* 2013 Aug 28; 218 (3): R37–47.
11. Clarke G, Stilling RM, Kennedy PJ, Stanton C, Cryan JF, Dinan TG. Minireview: Gut Microbiota: The Neglected Endocrine Organ. *Mol Endocrinol.* 2014 Aug; 28 (8): 1221–38.
12. Rooks MG, Garrett WS. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat Rev Immunol.* 2016 May 27; 16 (6): 341–52.
13. Canfora EE, Jocken JW, Blaak EE. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nat Rev Endocrinol.* 2015 Oct; 11 (10): 577–91.
14. Kamada N, Kim Y-G, Sham HP, Vallance BA, Puente JL, Martens EC, et al. Regulated virulence controls the ability of a pathogen to compete with the gut microbiota. *Science.* 2012 Jun 8; 336 (6086): 1325–9.
15. Dobson A, Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocin production: a probiotic trait? *Appl Environ Microbiol.* 2012 Jan; 78 (1): 1–6.
16. Buffie CG, Bucci V, Stein RR, McKenney PT, Ling L, Gobbourne A, et al. Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile*. *Nature.* 2015 Jan 8; 517 (7533): 205–8.
17. Ivashkin VT, Shifrin OS, Tertychny AS, Poluektova YeA, Lapina TL, Lyashenko OS, et al. [*Clostridium difficile*-associated disease]. *Rossiiskii zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii.* 2016; 25 (6): 5–17. Russian.
18. Goldenberg JZ, Ma SS, Saxton JD, Martzen MR, Vandvik PO, Thorlund K, et al. Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013 May 31; (5): CD006095.
19. Cammarota G, Ianiro G, Gasbarrini A. Fecal Microbiota Transplantation for the Treatment of *Clostridium difficile* Infection: a Systematic Review. *J Clin Gastroenterol.* 2014 Sep; 48 (8): 693–702.
20. Olle B. Who Will Figure Out How to Make a Business Out of Fecal Transplants? [Internet]. 2013 May 3 [cited 2017 Apr 3]; [about 7 p.]. Available from: <http://www.fiercebiotech.com/r-d/who-will-figure-out-how-to-make-a-business-out-of-fecal-transplants>
21. Hodzic Z, Bolock AM, Good M. The Role of Mucosal Immunity in the Pathogenesis of Necrotizing Enterocolitis. *Front Pediatr.* 2017 Mar 3; 5: 40.
22. Pammil M, Cope J, Tarr PI, Warner BB, Morrow AL, Mai V, et al. Intestinal dysbiosis in preterm infants preceding necrotizing enterocolitis: a systematic review and meta-analysis. *Microbiome.* 2017 Mar 9; 5 (1): 31.
23. AlFaleh K, Anabrees J. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014 Apr 10; (4): CD005496.
24. Leung A, Tsoi H, Yu J. *Fusobacterium* and *Escherichia*: models of colorectal cancer driven by microbiota and the utility of microbiota in colorectal cancer screening. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015 May; 9 (5): 651–7.

25. Graillot V, Dormoy I, Dupuy J, Shay JW, Huc L, Mirey G, et al. Genotoxicity of Cytolethal Distending Toxin (CDT) on Isogenic Human Colorectal Cell Lines: Potential Promoting Effects for Colorectal Carcinogenesis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016 Mar 23; 6: 34.
26. Needell JC, Zipris D. The Role of the Intestinal Microbiome in Type 1 Diabetes Pathogenesis. *Curr Diab Rep.* 2016 Oct; 16 (10): 89.
27. Boulangé CL, Neves AL, Chilloux J, Nicholson JK, Dumas M-E. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome Med.* 2016 Apr 20; 8 (1): 42.
28. Ding HT, Taur Y, Walkup JT. Gut Microbiota and Autism: Key Concepts and Findings. *J Autism Dev Disord.* 2017 Feb; 47 (2): 480–9.
29. Jünemann S, Prior K, Szczepanowski R, Harks I, Ehmke B, Goesmann A, et al. Bacterial community shift in treated periodontitis patients revealed by ion torrent 16S rRNA gene amplicon sequencing. *PLoS One.* 2012; 7 (8): e41606.
30. Zorina OA, Kulakov AA, Rebrikov DV. [Quantitative detection of periodontopathogenic microflora in periodontitis and healthy control]. *Stomatologiya (Mosk).* 2011; 90 (3): 40–2. Russian.
31. Yanushevich OO, Ayzazova RA, Shibaeva AV, Rebrikov DV, Trubnikova EV, Kudykina YK, et al. Quantitative PCR studies of Aggregatibacter actinomycetemcomitans and Treponema denticola/Tanarella forsythensis Complex as Etiological Factors of Chronic Periodontitis. *Bull Exp Biol Med.* 2016 Feb; 160 (4): 495–7.
32. Shibaeva AV, Ayzazova RA, Rebrikov DV, Trubnikova EV, Kudykina YK, Belyakova AV, et al. [Use of the real-time PCR for study of the periodontal microbiome in patients with combined pathology of gastroduodenal zone and chronic periodontitis]. *Mol Gen Mikrobiol Virusol.* 2016; 34 (1): 26–30. Russian.
33. Petrukhina NB, Zorina OA, Shikh EV, Shibaeva AV, Shevelev AB. [Study of mutual dependence of periodontal and colonic microbiome in health and pathology using NSG-sequencing]. *Stomatologiya (Mosk).* 2016; 95 (2): 8–13. Russian.
34. Zorina OA, Aymadinova NK, Basova AA, Shibaeva AV, Rebrikov DV. [Gender-related marker pathogens of periodontal disease in chronic periodontitis]. *Stomatologiya (Mosk).* 2016; 95 (3): 10–6. Russian.
35. Zorina OA, Petrukhina NB, Basova AA, Shibaeva AV, Trubnikova EV, Shevelev AB. [Identification of key markers of normal and pathogenic microbiota determining health of periodontium by NGS-sequencing 16S-rDNA libraries of periodontal swabs]. *Stomatologiya (Mosk).* 2014; 93 (6): 25–31. Russian.
36. Franasiak JM, Scott RT Jr. Reproductive tract microbiome in assisted reproductive technologies. *Fertil Steril.* 2015 Dec; 104 (6): 1364–71.
37. Boldyreva MN, Bairamova GR, Burmenskaya OV. Diagnosticheskie vozmozhnosti metoda PtsR v rezhime real'nogo vremeni dlya otsenki bioty i lokal'nogo vospaleniya v tkanyakh urogenital'nogo trakta. *Spravochnik zaveduyushchego KDL.* 2015; (1): 9–17. Russian.
38. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature.* 2012 Jun 13; 486 (7402): 207–14.
39. Swidsinski A, Verstraelen H, Loening-Baucke V, Swidsinski S, Mendling W, Halwani Z. Presence of a polymicrobial endometrial biofilm in patients with bacterial vaginosis. *PLoS One.* 2013; 8 (1): e53997.
40. Selman H, Mariani M, Barnocchi N, Mencacci A, Bistoni F, Arena S, et al. Examination of bacterial contamination at the time of embryo transfer, and its impact on the IVF/pregnancy outcome. *J Assist Reprod Genet.* 2007 Sep; 24 (9): 395–9.
41. Shipitsyna EV, Martikainen ZM, Vorobyova NE, Ermoshkina MS, Stepanova OS, Donnikov AE, et al. [Investigation of vaginal microbiocenosis using the test Femoflor]. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh boleznei.* 2009; 58 (3): 44–50. Russian.
42. Boldyreva MN, Lipova EV, Alexeev LP, Vitvitskaya JuG, Gouskova IA. [Features of urogenital tract's biota determined by means of real-time PCR among women of reproductive age]. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh boleznei.* 2009; 58 (6): 36–42. Russian.
43. Hyman RW, Herndon CN, Jiang H, Palm C, Fukushima M, Bernstein D, et al. The dynamics of the vaginal microbiome during infertility therapy with in vitro fertilization-embryo transfer. *J Assist Reprod Genet.* 2012 Feb; 29 (2): 105–15.
44. Hein M, Petersen AC, Helmgig RB, Uldbjerg N, Reinholdt J. Immunoglobulin levels and phagocytes in the cervical mucus plug at term of pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2005 Aug; 84 (8): 734–42.
45. Ulcova-Gallova Z. Immunological and physicochemical properties of cervical ovulatory mucus. *J Reprod Immunol.* 2010 Nov; 86 (2): 115–21.
46. Lieberman JA, Moscicki AB, Sumerel JL, Ma Y, Scott ME. Determination of cytokine protein levels in cervical mucus samples from young women by a multiplex immunoassay method and assessment of correlates. *Clin Vaccine Immunol.* 2008 Jan; 15 (1): 49–54.
47. Ming L, Xiaoling P, Yan L, Lili W, Qi W, Xiyong Y, et al. Purification of antimicrobial factors from human cervical mucus. *Hum Reprod.* 2007 Jul; 22 (7): 1810–5.
48. Ansbacher R, Boyson WA, Morris JA. Sterility of the uterine cavity. *Am J Obstet Gynecol.* 1967 Oct 1; 99 (3): 394–6.
49. Zervomanolakis I, Ott HW, Hadziomerovic D, Mattle V, Seeber BE, Virgolini I, et al. Physiology of upward transport in the human female genital tract. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Apr; 1101: 1–20.
50. Mitchell CM, Haick A, Nkwopara E, Garcia R, Rendi M, Agnew K, et al. Colonization of the upper genital tract by vaginal bacterial species in nonpregnant women. *Am J Obstet Gynecol.* 2015 May; 212 (5): 611. e1–9.
51. Artley JK, Braude PR, Cooper P. Vaginal squamous cells in follicular aspirates following transvaginal puncture. *Hum Reprod.* 1993 Aug; 8 (8): 1272–3.
52. Cottell E, McMorrow J, Lennon B, Fawcay M, Cafferkey M, Harrison RF. Microbial contamination in an in vitro fertilization-embryo transfer system. *Fertil Steril.* 1996 Nov; 66 (5): 776–80.
53. Saltes B, Molo MW, Binor Z, Radwanska E. Bacterial contamination after transvaginal aspiration (TVA) of oocytes. *J Assist Reprod Genet.* 1995 Oct; 12 (9): 657–8.
54. Pelzer ES, Allan JA, Cunningham K, Mengersen K, Allan JM, Launchbury T, et al. Microbial colonization of follicular fluid: alterations in cytokine expression and adverse assisted reproduction technology outcomes. *Hum Reprod.* 2011 Jul; 26 (7): 1799–812.
55. Spence MR, Blanco LJ, Patel J, Brockman MT. A comparative evaluation of vaginal, cervical and peritoneal flora in normal, healthy women: a preliminary report. *Sex Transm Dis.* 1982 Jan-Mar; 9 (1): 37–40.
56. Pelzer ES, Allan JA, Waterhouse MA, Ross T, Beagley KW, Knox CL. Microorganisms within Human Follicular Fluid: Effects on IVF. *PLoS One.* 2013; 8 (3): e59062.
57. Bowie WR, Pollock HM, Forsyth PS, Floyd JF, Alexander ER, Wang SP, et al. Bacteriology of the urethra in normal men and men with nongonococcal urethritis. *J Clin Microbiol.* 1977 Nov; 6 (5): 482–8.
58. Nelson DE, Van Der Pol B, Dong Q, Revanna KV, Fan B, Easwaran S, et al. Characteristic Male Urine Microbiomes Associate with Asymptomatic Sexually Transmitted Infection. *PLoS One.* 2010 Nov 24; 5 (11): e14116.
59. Liu CM, Hungate BA, Tobian AA, Ravel J, Prodder JL, Serwadda D, et al. Penile microbiota and female partner bacterial vaginosis in Rakai, Uganda. *MBio.* 2015 Jun 16; 6 (3): e00589–15.
60. Ma B, Forney LJ, Ravel J. Vaginal microbiome: rethinking health and disease. *Annu Rev Microbiol.* 2012; 66: 371–89.
61. Hou D, Zhou X, Zhong X, Settles ML, Herring J, Wang L, et al. Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men. *Fertil Steril.* 2013 Nov; 100 (5): 1261–9.
62. Weng SL, Chiu CM, Lin FM, Huang WC, Liang C, Yang T, et al. Bacterial communities in semen from men of infertile couples: metagenomic sequencing reveals relationships of seminal microbiota to semen quality. *PLoS One.* 2014 Oct 23; 9 (10): e110152.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ АМИНОГЛИКОЗИДФОСФОТРАНСФЕРАЗ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ В МИКРОБИОТЕ ЖИТЕЛЕЙ РОССИИ

А. С. Ковтун^{1,2}, М. Г. Алексеева¹, О. В. Аверина¹, В. Н. Даниленко^{1,2,3} ✉

¹ Лаборатория генетики микроорганизмов, отдел генетических основ биотехнологии, Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова РАН, Москва

² Факультет биологической и медицинской физики, Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный

³ Научно-исследовательский центр биотехнологии антибиотиков «БИОАН», Москва

Устойчивость бактерий к антибиотикам является одной из самых серьезных проблем в современной медицине. Эффективность антимикробной терапии снижается вследствие работы бактериальных ферментов — аминогликозидфосфотрансфераз (Aph). Гены *aph* аннотированы в геномах многих бактерий, в том числе комменсалов микробиоты кишечника, из геномов которых они могут попадать в геномы клинически значимых штаммов. Анализ *in silico* 11 метагеномов кишечника здоровых людей из России показал наличие в 7 образцах микробиоты 3 генов *aph* из 21, включенного в каталог, составленный для исследования: *aph(3')-Ib*, *aph(3')-IIIa* и *aph(2')-Ia*. Наиболее распространенным оказался ген *aph(3')-IIIa*, найденный в 6 исследованных метагеномах. Важно, что этот ген впервые был обнаружен у *Enterococcus faecalis*, но в данной работе он был идентифицирован в генетическом окружении, характерном для комменсальной бактерии *Ruminococcus obeum* и условно-патогенных бактерий *Enterococcus faecium*, *Roseburia hominis*, *Streptococcus pyogenes* и *Staphylococcus epidermidis*. То же наблюдали для гена *aph(2')-Ia*: он был обнаружен для *Clostridium difficile*, а не для *E. faecalis*. Полученные результаты согласуются с литературными данными, указывающими на значимое влияние географического происхождения людей на распространенность *aph*-генов. Также, учитывая данные исследования, представляется обоснованным при клиническом обследовании пациентов с инфекционными заболеваниями и назначении антибиотиков для их лечения анализировать антибиотикорезистентность не только бактерии-возбудителя, но и микробиоты пациента.

Ключевые слова: устойчивость к антибиотикам, антибиотикорезистентность, аминогликозидфосфотрансферазы, Aph, клинические штаммы бактерий, микробиом, микробиота, кишечник человека

Благодарности: авторы благодарят профессора Сергея Сидоренко из Северо-Западного государственного медицинского университета имени И. И. Мечникова за обсуждение

✉ **Для корреспонденции:** Даниленко Валерий Николаевич
ул. Губкина, д. 3, г. Москва, 119991; valerid@vigg.ru

Статья получена: 29.03.2017 **Статья принята к печати:** 07.04.2017

IDENTIFICATION OF AMINOGLYCOSIDE PHOSPHOTRANSFERASES OF CLINICAL BACTERIAL ISOLATES IN THE MICROBIOTA OF RUSSIANS

Kovtun AS^{1,2}, Alekseeva MG¹, Averina OV¹, Danilenko VN^{1,2,3} ✉

¹ Laboratory of bacterial genetics, Department of genetics and biotechnology, Vavilov Institute of General Genetics of RAS, Moscow, Russia

² Department of biological and medical physics, Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny, Russia

³ Scientific Research Center for Biotechnology of Antibiotics "BIOAN", Moscow, Russia

Antibiotic resistance is one of the biggest threats to modern medicine. Response to antimicrobial treatment is seriously disrupted by aminoglycoside phosphotransferases (Aph) — enzymes produced by bacteria. The *aph* genes were annotated in many bacterial species, including commensals of the gut microbiota that can transfer these genes to clinically important strains. For this study we prepared a catalog of 21 *aph* genes. The *in silico* analysis of 11 intestinal microbiomes of healthy Russians revealed the presence of 3 cataloged *aph* genes in 7 microbiota samples, namely *aph(3')-Ib*, *aph(3')-IIIa* and *aph(2')-Ia*. The most frequent was the *aph(3')-IIIa* gene detected in 6 metagenomes. Of note, this gene was first discovered in *Enterococcus faecalis*, but in this study we observed it in sequences typical for commensal *Ruminococcus obeum* and opportunistic *Enterococcus faecium*, *Roseburia hominis*, *Streptococcus pyogenes* and *Staphylococcus epidermidis*. Similarly, *aph(2')-Ia* originally present in *E. faecalis* was detected in a sequence typical for *Clostridium difficile*. Our findings are consistent with the reports on the strong association between the geographical origin of the individual and frequency of *aph* genes. We suggest that clinical examination should include antibiotic sensitivity tests run not only on the causative agent, but also on the gut microbiota, for a better treatment outcome.

Keywords: antibiotic resistance, aminoglycoside phosphotransferase (Aph), clinical isolates of bacteria, human gut microbiota

Acknowledgements: authors thank Professor Sergey Sidorenko of North-West State Medial University for his comments on the article.

✉ **Correspondence should be addressed:** Valery Danilenko
ul. Gubkina, d. 3, Moscow, Russia, 119991; valerid@vigg.ru

Received: 29.03.2017 **Accepted:** 07.04.2017

Ежегодно только в США по крайней мере 2 миллиона человек оказываются инфицированы бактериями, устойчивыми к антибиотикам, и по меньшей мере 23 000 человек умирают от устойчивых бактериальных инфекций [1]. Растущая антибиотикорезистентность патогенов человека является серьезной клинической проблемой с важными экологическими последствиями. По данным Antibiotic Resistance Genes Database (ARDB) [2], в настоящее время насчитывается 13 293 гена устойчивости микроорганизмов к антибиотикам. Возможность обмена генетической информацией между бактериями в смешанных популяциях обуславливает существование множества потенциальных сложных путей распространения генов резистентности [3].

Кишечник человека, содержащий наибольшее количество клеток (около 10^{14}) и видов (около 1000) микроорганизмов [4], образует динамический резервуар генов устойчивости к антибиотикам (резистому) [5]. Лечение с использованием антибактериальных агентов оказывает значительное влияние на резистому кишечника и приводит к росту интенсивности горизонтального переноса генов и селекции устойчивых форм [6]. Анализ генов устойчивости представителей кишечной микробиоты показывает, что комменсальные бактерии желудочно-кишечного тракта могут быть резервуарами генов устойчивости для других видов бактерий, в том числе патогенных [7].

Для изучения проблемы устойчивости к антибиотикам используют высокотехнологичные методы секвенирования ДНК нового поколения, методы биоинформатики и аналитической химии, что позволяет проводить идентификацию более 20–30 кластеров генов, связанных с устойчивостью к антибиотикам [8]. В Центре по изучению генома и системной биологии Вашингтонского университета был проведен биоинформатический анализ распространения генов устойчивости к 18 клинически значимым антибиотикам. Были выявлены гены устойчивости к двум из наиболее широко используемых классов антибиотиков в клинике и в сельском хозяйстве — β -лактамам и тетрациклинам [9].

Серьезную угрозу для антимикробной терапии представляют аминогликозидфосфотрансферазы (Aph) [10]. Гены этих ферментов впервые были обнаружены в плазмидах и мобильных элементах клинических штаммов грамотрицательных и грамположительных бактерий [11]. Проведенный филогенетический анализ Aph клинических штаммов и штаммов-продуцентов аминогликозидных антибиотиков [12] показал, что в зависимости от положения гидроксильной группы антибиотика, модифицируемой ферментом, различают 7 подсемейств аминогликозидфосфотрансфераз: Aph(2''), Aph(3'), Aph(3''), Aph(4), Aph(6), Aph(7'') и Aph(9).

Гены *aph* аннотированы в геномах многих бактерий, в том числе непатогенных штаммов бактерий микрофлоры кишечника, от которых они могут передаваться клиническим штаммам [13]. Анализ метагеномной ДНК кишечника новорожденных показал, что уже в это время кишечник является резервуаром многочисленных генов резистентности к аминогликозидам и β -лактамам [14].

При сравнении метагеномов кишечника 832 человек из десяти разных стран (Англии, Финляндии, Франции, Италии, Норвегии, Шотландии, США, Японии, Китая и Малави) было установлено, что существенное влияние на состав генов устойчивости оказывало географическое происхождение человека [15].

В различных лабораториях мира были проведены исследования распространения генов *aph*. Ген *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* являлся наиболее распространенным геном

устойчивости к аминогликозидам у энтерококков и был выявлен в 26 из 27 изолятов, выделенных из организмов пациентов иранской больницы [16]. При эпидемиологическом исследовании 534 клинических штаммов, выделенных в японской больнице, по распределению 12 генов аминогликозид-модифицирующих ферментов в трех штаммах *Enterococcus faecium* был идентифицирован ген *aph(2'')-Ie*, в трех штаммах *E. faecalis*, *E. faecium* и *E. avium* — ген *ant(9)-Ia*. Нуклеотидные последовательности генов *ant(9)-Ia* из этих трех энтерококков были идентичны генам *Staphylococcus aureus* и были расположены в транспозоне Tn554 [17]. Поскольку аминогликозиды часто используются для лечения стафилококковых инфекций, исследовалась распространенность устойчивости к аминогликозидам среди метициллин-резистентных штаммов *S. aureus*, выделенных из организмов пациентов иранской клиники. Были обнаружены гены *aac(6')-Ie-aph(2'')*, *aph(3')-IIIa* и *ant(4')-Ia* среди 134 (77,0 %), 119 (68,4 %) и 122 (70,1 %) изолятов соответственно [18].

В связи с этим актуальна задача идентификации генов аминогликозидфосфотрансфераз в метагеномах желудочно-кишечного тракта жителей России.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пробоподготовка и секвенирование ДНК микробиома

Объектом исследования была кишечная микробиота 11 здоровых людей разного возраста и пола — жителей Москвы и Твери. Отбирали пробы фекалий, используя стандартные методики [19]. До использования в экспериментах образцы хранили замороженными ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Тотальную бактериальную геномную ДНК выделяли из навесок замороженного кала при помощи набора реагентов QIAamp Fast DNA Stool Mini kit (Qiagen, Германия) по протоколу, рекомендованному производителем. Использовали версию протокола с условиями лизиса для преимущественного выделения ДНК микроорганизмов Protocol: Isolation of DNA from Stool for Pathogen Detection (Qiagen). Концентрацию выделенной ДНК определяли с помощью прибора Qubit (Invitrogen, США). Полученная геномная ДНК была фрагментирована на ультразвуковом фрагментаторе Covaris M220 (Covaris, США) до размера фрагментов 100–700 пар оснований (средний размер — ~ 350 п. о.).

Библиотеки для секвенирования готовили с использованием набора реагентов NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina (NEB, Великобритания). Для секвенирования были отобраны фрагменты длиной от 250 до 500 п. о., включая адаптерные последовательности. Библиотеки были проверены при помощи анализатора Agilent TapeStation (Agilent Technologies, Германия) и смешаны эквимолярно. Последовательности адаптеров, использованных при подготовке библиотек: Read1 (AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACNNNNNNATCT CGTATGCCGTCTTCTGCTTG) и Read2 (AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGATAGATCTCG GTGGTCCCGTATCAT), где NNNNNN — шестинуклеотидный индекс, уникальный для каждого образца. После контроля качества и определения количества библиотек при помощи количественной полимеразной цепной реакции пул библиотек был секвенирован на одной дорожке прибора Illumina HiSeq 4000 (101 цикл с каждого конца фрагментов) с использованием реактивов HiSeq 4000 SBS sequencing kit version 1 (Illumina, США). Файлы FASTQ были получены с помощью программы

bcl2fastq v2.17.1.14 Conversion Software (Illumina). Формат записи строки данных о качестве — Phred 33. Полученные метагеномы были депонированы в базе данных Sequence Read Archive (SRA) NCBI. Описание полученных библиотек представлено в табл. 1.

Контроль качества метагеномных библиотек и сборка

Контроль качества полученных метагеномных библиотек проводили при помощи программы FastQC [20]. Тримминг проводили при помощи программы trimmomatic [21]. Фильтрация контаминации ридов, полученными из человеческого генома, проводили методом картирования метагеномных ридов на сборку генома человека. Для картирования использовали программа Bowtie2 [22]. Сборку метагеномных ридов до уровня контигов проводили при помощи программы SPAdes [23]. Описание полученных сборок представлено в табл. 2.

Составление каталога генов аминокликозидфосфотрансфераз

На основе литературных данных [12] был сформирован каталог генов аминокликозидфосфотрансфераз, найденных в клинических штаммах бактерий *Acinetobacter baumannii*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus circulans*, *Burkholderia pseudomallei*, *Campylobacter jejuni*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus faecium*, *Legionella pneumophila* и *Pseudomonas aeruginosa*.

Всего в каталог вошел 21 ген. Также был создан каталог аминокислотных последовательностей, кодируемых отобранными генами аминокликозидфосфотрансфераз.

Анализ метагеномов

Для поиска генов аминокликозидфосфотрансфераз в полученных сборках метагеномов была написана программа на языке Perl. Основной задачей программы являлся запуск анализа метагеномов с помощью BLASTX и последующий отбор результатов по двум параметрам: гомологии и относительной длине выравнивания. В качестве базы данных для поиска использовали составленный в рамках исследования каталог из 31 аминокислотной последовательности. Отбор результатов выравниваний, полученных с помощью BLASTX, проводили с применением фильтров по гомологии и относительной длине выравнивания. Относительная длина выравнивания вычислялась программой по формуле:

$$L_{\text{относит}} = \frac{L_{\text{выравнив}}}{L_{\text{послед}}},$$

где $L_{\text{выравнив}}$ — это длина полученного выравнивания, а $L_{\text{послед}}$ — это длина референсной аминокислотной последовательности из каталога. Поскольку в данной работе не ставилась задача поиска новых генов аминокликозидфосфотрансфераз, в качестве минимального значения гомологии выбрали 90 %, а минимального значения относительной длины выравнивания — 80 %. Для определения видового состава исследуемых метагеномов была использована программа MetaPhlan2 [24].

Таблица 1. Описание исследуемых метагеномов

№	Образец	Пол	Возраст, лет	Регион	Номер в Genbank
1	4B_S2	Ж	34	Россия, г. Тверь	SRX1870055
2	12_S1	Ж	28	Россия, г. Тверь	SRX1878777
3	D3F	М	15	Россия, г. Москва	SRX2672491
4	D4F	М	15	Россия, г. Москва	SRX2672492
5	D5F	М	15	Россия, г. Москва	SRX2672493
6	D6F	М	15	Россия, г. Москва	SRX2672494
7	D11F	М	15	Россия, г. Москва	SRX2672495
8	D12F	Ж	15	Россия, г. Москва	SRX2672496
9	D13F	Ж	15	Россия, г. Москва	SRX2672497
10	DG_S1	Ж	28	Россия, г. Тверь	SRX1869842
11	HG550	Ж	6	Россия, г. Тверь	SRX1869839

Таблица 2. Описание сборок метагеномов

№	Образец	Размер сборки, Мбаз	Максимальная длина контига, п. н.	N50, п. н.
1	4B_S2	73	50917	2790
2	12_S1	160	111721	3800
3	D3F	106	855598	9284
4	D4F	237	433763	5677
5	D5F	140	517131	21016
6	D6F	238	544506	5742
7	D11F	46	1671967	7207
8	D12F	147	545374	7999
9	D13F	317	643760	12617
10	DG_S1	208	125246	2621
11	HG550	82	69816	3121

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Формирование каталога генов
аминогликозидфосфотрансфераз из клинических
штаммов

В зависимости от положения гидроксильной группы антибиотика, модифицируемой ферментом, различают 7 подсемейств аминогликозидфосфотрансфераз: Aph(2''), Aph(3'), Aph(3''), Aph(4), Aph(6), Aph(7'') и Aph(9). Каталог генов клинических штаммов был составлен путем обобщения данных, представленных в обзоре [12]. Каталог генов аминогликозидфосфотрансфераз из клинических штаммов приведен в табл. 3.

Поиск генов аминогликозидфосфотрансфераз
в российских метагеномах

С помощью созданной программы были проанализированы метагеномы кишечника 11 здоровых людей из России. Результаты анализа представлены в табл. 4. Всего были идентифицированы 3 гена в 7 метагеномах. Все гены были идентифицированы с гомологией 100 %. Самым распространенным оказался ген *aph(3')-IIIa*, не найденный только в одном метагеноме из семи — D5F. В метагеноме D12F были найдены два гена: *aph(2'')-IIa* и *aph(3')-IIIa*. Ген *aph(3'')-Ib* был идентифицирован только в метагеноме D5F.

Исследуемые метагеномы были проанализированы по видовому составу с помощью программы MetaPhlan2. Риды, для которых был определен видовой состав, были картированы на метагеномные контиги с помощью Bowtie2. Таким образом, была определена видовой принадлежность контигов, в которых были найдены гены аминогликозидфосфотрансфераз [неопубликованные данные, А. С. Ковтун]. Результаты биоинформатического анализа метагеномов представлены в табл. 5.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенный *in silico* анализ 11 кишечных метагеномов от здоровых россиян показал наличие генов аминогликозидфосфотрансфераз только в 7 из них и только 3 генов из 21, найденных в клинических штаммах бактерий *Acinetobacter baumannii*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus circulans*, *Burkholderia pseudomallei*, *Campylobacter jejuni*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus faecium*, *Legionella pneumophila* и *Pseudomonas aeruginosa* и включенных в составленный для исследования каталог *aph*-генов (табл. 3). Речь идет о следующих генах: *aph(3'')-Ib*, *aph(3')-IIIa* и *aph(2'')-Ia*. Наиболее распространенным оказался ген *aph(3')-IIIa* (CAA24789), найденный в 6 исследуемых метагеномах. Этот ген ранее был выявлен в геноме *E. faecalis* как определяющий устойчивость

Таблица 3. Каталог генов аминогликозидфосфотрансфераз из клинических штаммов

Название гена	Ссылка на GenBank	Бактерия*	Локализация генов	Устойчивость к аминогликозидам
<i>aac(6)-Ie-aph(2'')-Ia</i>	AAA26865	<i>Enterococcus faecalis</i>	Хромосома	Тобрамицин
<i>aph(2'')-IIa</i>	AAK63040	<i>Escherichia coli</i>	Хромосома	Канамицин, гентамицин
<i>aph(2'')-IIIa</i>	AAB49832	<i>Enterococcus gallinarum</i>	Хромосома	Гентамицин
<i>aph(2'')-IVa</i>	AAC14693	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Хромосома	Гентамицин
<i>aph(2'')-Ie</i>	AAW59417	<i>Enterococcus faecium</i>	Хромосома	Гентамицин
<i>aph(3')-Ia</i>	CAA23656	<i>Escherichia coli</i>	Транспозон Tn903	Канамицин
<i>aph(3')-Ib</i>	AIL00451	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Хромосома	
<i>aph(3')-IIa</i>	CAA23892	<i>Escherichia coli</i>	Транспозон Tn5	Неомицин
<i>aph(3')-IIb</i>	AAG07506	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Хромосома	Канамицин, неомицин, бутирозин, селдомицин
<i>aph(3')-IIIa</i>	CAA24789	<i>Enterococcus faecalis</i>	Хромосома	Канамицин
<i>aph(3')-IVa</i>	P00553	<i>Bacillus circulans</i>	Транспозоны Tn5 и Tn903	Канамицин, неомицин
<i>aph(3')-VIa</i>	CAA30578	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	Канамицин, амикацин
<i>aph(3')-VIb</i>	CAF29483	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Транспозон Tn5393	Канамицин, стрептомицин, амикацин
<i>aph(3')-VIIa</i>	P14508	<i>Campylobacter jejuni</i>	Хромосома	Канамицин, неомицин
<i>aph(3')-VIIIa</i>	P14509	<i>Escherichia coli</i>	Плазмида RP4	Канамицин, неомицин
<i>aph(3'')-Ib</i>	AAA26442	<i>Escherichia coli</i>	Плазмида RSF1010	Стрептомицин
<i>aph(4)-Ia</i>	P00557	<i>Escherichia coli</i>	Плазмида pJR225	Гигромицин
<i>aph(4)-Ib</i>	CAA52372	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Хромосома	Гигромицин
<i>aph(6)-Ic</i>	CAA25854	<i>Escherichia coli</i>	Транспозон Tn5	Стрептомицин
<i>aph(6)-Id</i>	AAA26443	<i>Escherichia coli</i>	Плазмида RSF1010	Стрептомицин
<i>aph(9)-Ia</i>	AAB58447	<i>Legionella pneumophila</i>	Хромосома	Спектиномицин

Примечание. * — организм, из которого был впервые выделен данный ген.

Таблица 4. Гены аминогликозидфосфотрансфераз, идентифицированные в исследуемых метагеномах

Название гена	Номера метагеномов										
	4B_S2	12_S1	D3F	D4F	D5F	D6F	D11F	D12F	D13F	DG_S1	HG550
<i>aph(2'')-Ia</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>aph(3'')-Ib</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>aph(3')-IIIa</i>	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+

Таблица 5. Видовой состав исследуемых метагеномов, в которых были идентифицированы гены аминогликозидфосфотрансфераз

Метагеном	Длины контигов, п. н.	<i>aph(2'')-Ia</i>	<i>aph(3')-Ib</i>	<i>aph(3')-IIIa</i>
D3F	3389	–	–	<i>Enterococcus faecium</i>
D4F	6439	–	–	<i>Ruminococcus obeum</i>
D5F	1422	–	<i>Escherichia coli</i>	–
D6F	979	–	–	<i>Enterococcus faecium</i>
D12F	5607 (для гена <i>aph(3')-IIIa</i>); 4407 (для гена <i>aph(2'')-Ia</i>)	<i>Clostridium difficile</i>	–	<i>Roseburia hominis</i>
D13F	4356	–	–	<i>Streptococcus pyogenes</i>
HG550	2242	–	–	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

к канамицину. Только в одном метагеноме встречался ген *aph(3')-Ib* (AAA26442), выявленный ранее в геноме *E. coli* как определяющий устойчивость к стрептомицину, и ген *aph(2'')-Ia* (AAA26865), выявленный ранее в геноме *E. faecalis* как определяющий устойчивость к тобрамицину (табл. 3).

Интересно, что анализ контигов, в которых были выявлены гены аминогликозидфосфотрансфераз, показал их присутствие в геномах бактерий иных видов. Ген *aph(3')-IIIa* был обнаружен в генетическом окружении, характерном для комменсальной бактерии *Ruminococcus obeum*, а также условно-патогенных бактерий *E. faecium*, *Roseburia hominis*, *Streptococcus pyogenes* и *Staphylococcus epidermidis*, но не для *E. faecalis*. Ген *aph(2'')-Ia* был обнаружен для *Clostridium difficile*, а не *E. faecalis* (табл. 3, табл. 5). Таким образом, этот ген, оказавшийся наиболее распространенным у энтерококков в исследовании [16], встретился только в одном российском метагеноме и не в энтерококке. Гены *aph(2'')-Ia* и *aph(3')-IIIa* ранее были обнаружены у метициллин-резистентных штаммов *Staphylococcus aureus* [17], но в российском метагеноме ген *aph(3')-IIIa* присутствовал в генетическом окружении, характерном для *Staphylococcus epidermidis*. Ген *aph(3')-Ib* был обнаружен в *E. coli*.

Представленные результаты согласуются с данными, полученными при сравнительном анализе метагеномов кишечника жителей разных стран мира: возраст, пол и состояние здоровья человека мало влияют на антибиотикорезистентный потенциал микробиоты кишечника, тогда как географическое происхождение человека оказывает существенное влияние на состав резистом [15]. Редкая встречаемость *aph*-генов в российских метагеномах и их принадлежность к определенным классификационным группам могут указывать на региональную специфичность состава микробиоты и более редкое использование ами-

ногликозидов в лечебных целях у людей, чей микробиом был использован для данного исследования. С другой стороны, у анаэробных бактерий, являющихся большинством в популяции кишечника, отсутствие *aph*-генов может объясняться тем, что у них нет цитохром-опосредованного транспорта [25]. Важным результатом является наличие в микробиоме здорового человека условно-патогенных бактерий, содержащих *aph*-гены.

Выводы

В 7 образцах микробиоты 11 здоровых жителей России было установлено наличие генов аминогликозидфосфотрансфераз, ранее выявленных в клинических штаммах бактерий: *aph(3')-Ib*, *aph(3')-IIIa* и *aph(2'')-Ia*. Наиболее распространенным оказался ген *aph(3')-IIIa*. Обнаруженные гены встречались у условно-патогенных бактерий *Enterococcus faecium*, *Roseburia hominis*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis*. Два из них, *E. coli* и *E. faecium*, относятся к 12 самым опасным бактериям (по данным Всемирной организации здравоохранения). В связи с этим при клиническом обследовании пациентов с инфекционными заболеваниями и назначении антибиотиков для их лечения целесообразно проводить диагностический анализ на устойчивость к антибиотикам не только в отношении бактерии-возбудителя, но и в отношении микробиоты пациента.

Исследования распространенности генов устойчивости к антибиотикам в микробиоте желудочно-кишечного тракта российских людей представлены впервые в данной работе. Подобным образом, в том числе с использованием ПЦР-анализа, необходимо проводить поиск и других клинически важных генов устойчивости.

Литература

- Hossion AM, Sasaki K. Novel quercetin glycosides as potent anti-MRSA and anti-VRE agents. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2013 Dec; 8 (3): 198–205.
- McArthur AG, Waglechner N, Nizam F, Yan A, Azad MA, Baylay AJ, et al. The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Jul; 57 (7): 3348–57.
- Wooldridge M. Evidence for the circulation of antimicrobial-resistant strains and genes in nature and especially between humans and animals. *Rev Sci Tech.* 2012 Apr; 31 (1): 231–47.
- Schloissnig S, Arumugam M, Sunagawa S, Mitreva M, Tap J, Zhu A, et al. Genomic variation landscape of the human gut microbiome. *Nature.* 2013 Jan 3; 493 (7430): 45–50.
- Elbeheri AH, Aziz RK, Siam R. Antibiotic Resistome: Improving Detection and Quantification Accuracy for Comparative Metagenomics. *OMICS.* 2016 Apr; 20 (4): 229–38.
- Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2015 Jan; 13 (1): 42–51.
- Willmann M, El-Hadidi M, Huson DH, Schütz M, Weidenmaier C, Autenrieth IB, et al. Antibiotic Selection Pressure Determination through Sequence-Based Metagenomics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Dec; 59 (12): 7335–45.
- Perry JA, Westman EL, Wright GD. The antibiotic resistome: what's new? *Curr Opin Microbiol.* 2014 Oct; 21: 45–50.
- Gibson MK, Forsberg KJ, Dantas G. Improved annotation of antibiotic resistance determinants reveals microbial resistomes cluster by ecology. *ISME J.* 2015 Jan; 9 (1): 207–16.
- Shakya T, Wright GD. Nucleotide selectivity of antibiotic kinases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 May; 54 (5): 1909–13.
- Wright GD. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Chem Commun (Camb).* 2011 Apr 14; 47 (14): 4055–61.

12. Shakya T, Stogios PJ, Waglechner N, Evdokimova E, Ejim L, Blanchard JE, et al. A small molecule discrimination map of the antibiotic resistance kinome. *Chem Biol*. 2011 Dec 23; 18 (12): 1591–601.
13. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 2015 Aug 7; 21 (29): 8787–803.
14. Fouhy F, Ogilvie LA, Jones BV, Ross RP, Ryan AC, Dempsey EM, et al. Identification of aminoglycoside and β -lactam resistance genes from within an infant gut functional metagenomic library. *PLoS One*. 2014 Sep 23; 9 (9): e108016.
15. Forslund K, Sunagawa S, Coelho LP, Bork P. Metagenomic insights into the human gut resistome and the forces that shape it. *Bioessays*. 2014 Mar; 36 (3): 316–29.
16. Emaneini M, Khoramian B, Jabalameli F, Beigverdi R, Asadollahi K, Taherikalani M, et al. Prevalence of high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in an Iranian hospital. *J Prev Med Hyg*. 2016 Dec; 57 (4): E197–E200.
17. Mahbub Alam M, Kobayashi N, Ishino M, Sumi A, Kobayashi K, Uehara N, et al. Detection of a novel *aph(2'')* allele (*aph(2'')-Ie*) conferring high-level gentamicin resistance and a spectinomycin resistance gene *ant(9)-Ia* (*aad 9*) in clinical isolates of enterococci. *Microb Drug Resist*. 2005 Fall; 11 (3): 239–47.
18. Mahdiyoun SM, Kazemian H, Ahanjan M, Hourii H, Goudarzi M. Frequency of Aminoglycoside-Resistance Genes in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolates from Hospitalized Patients. *Jundishapur J Microbiol*. 2016 Jul 26; 9 (8): e35052.
19. Standard operating procedure for fecal samples DNA extraction. The International Human Microbiome Standards (IHMS) project [интернет]. [дата обращения: 3 апреля 2017 г.]. Доступно по: <http://www.microbiome-standards.org/index.php#SOPS>
20. Andrews S. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. Version 0.11.5 [программное обеспечение]. Babraham Bioinformatics group. 8 марта 2016 г. [дата обращения: 3 апреля 2017 г.]. Доступно по: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
21. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014 Aug 1; 30 (15): 2114–20.
22. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2012 Mar 4; 9 (4): 357–9.
23. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J Comput Biol*. 2012 May; 19 (5): 455–77.
24. Truong DT, Franzosa EA, Tickle TL, Scholz M, Weingart G, Pasolli E, et al. MetaPhlan2 for enhanced metagenomic taxonomic profiling. *Nat Methods*. 2015 Oct; 12 (10): 902–3.
25. Mättö J, Suihko ML, Saarela M. Comparison of three test media for antimicrobial susceptibility testing of bifidobacteria using the Etest method. *Int J Antimicrob Agents*. 2006 Jul; 28 (1): 42–8.

References

1. Hossion AM, Sasaki K. Novel quercetin glycosides as potent anti-MRSA and anti-VRE agents. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*. 2013 Dec; 8 (3): 198–205.
2. McArthur AG, Waglechner N, Nizam F, Yan A, Azad MA, Baylay AJ, et al. The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Jul; 57 (7): 3348–57.
3. Wooldridge M. Evidence for the circulation of antimicrobial-resistant strains and genes in nature and especially between humans and animals. *Rev Sci Tech*. 2012 Apr; 31 (1): 231–47.
4. Schloissnig S, Arumugam M, Sunagawa S, Mitreva M, Tap J, Zhu A, et al. Genomic variation landscape of the human gut microbiome. *Nature*. 2013 Jan 3; 493 (7430): 45–50.
5. Elbeheri AH, Aziz RK, Siam R. Antibiotic Resistome: Improving Detection and Quantification Accuracy for Comparative Metagenomics. *OMICS*. 2016 Apr; 20 (4): 229–38.
6. Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2015 Jan; 13 (1): 42–51.
7. Willmann M, El-Hadidi M, Huson DH, Schütz M, Weidenmaier C, Autenrieth IB, et al. Antibiotic Selection Pressure Determination through Sequence-Based Metagenomics. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Dec; 59 (12): 7335–45.
8. Perry JA, Westman EL, Wright GD. The antibiotic resistome: what's new? *Curr Opin Microbiol*. 2014 Oct; 21: 45–50.
9. Gibson MK, Forsberg KJ, Dantas G. Improved annotation of antibiotic resistance determinants reveals microbial resistomes cluster by ecology. *ISME J*. 2015 Jan; 9 (1): 207–16.
10. Shakya T, Wright GD. Nucleotide selectivity of antibiotic kinases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 May; 54 (5): 1909–13.
11. Wright GD. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Chem Commun (Camb)*. 2011 Apr 14; 47 (14): 4055–61.
12. Shakya T, Stogios PJ, Waglechner N, Evdokimova E, Ejim L, Blanchard JE, et al. A small molecule discrimination map of the antibiotic resistance kinome. *Chem Biol*. 2011 Dec 23; 18 (12): 1591–601.
13. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 2015 Aug 7; 21 (29): 8787–803.
14. Fouhy F, Ogilvie LA, Jones BV, Ross RP, Ryan AC, Dempsey EM, et al. Identification of aminoglycoside and β -lactam resistance genes from within an infant gut functional metagenomic library. *PLoS One*. 2014 Sep 23; 9 (9): e108016.
15. Forslund K, Sunagawa S, Coelho LP, Bork P. Metagenomic insights into the human gut resistome and the forces that shape it. *Bioessays*. 2014 Mar; 36 (3): 316–29.
16. Emaneini M, Khoramian B, Jabalameli F, Beigverdi R, Asadollahi K, Taherikalani M, et al. Prevalence of high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in an Iranian hospital. *J Prev Med Hyg*. 2016 Dec; 57 (4): E197–E200.
17. Mahbub Alam M, Kobayashi N, Ishino M, Sumi A, Kobayashi K, Uehara N, et al. Detection of a novel *aph(2'')* allele (*aph(2'')-Ie*) conferring high-level gentamicin resistance and a spectinomycin resistance gene *ant(9)-Ia* (*aad 9*) in clinical isolates of enterococci. *Microb Drug Resist*. 2005 Fall; 11 (3): 239–47.
18. Mahdiyoun SM, Kazemian H, Ahanjan M, Hourii H, Goudarzi M. Frequency of Aminoglycoside-Resistance Genes in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolates from Hospitalized Patients. *Jundishapur J Microbiol*. 2016 Jul 26; 9 (8): e35052.
19. Standard operating procedure for fecal samples DNA extraction. The International Human Microbiome Standards (IHMS) project [Internet]. [cited 2017 Apr 3]. Available from: <http://www.microbiome-standards.org/index.php#SOPS>
20. Andrews S. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. Version 0.11.5 [software]. Babraham Bioinformatics group. 2016 Mar 8 [cited 2017 Apr 3]. Available from: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
21. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014 Aug 1; 30 (15): 2114–20.
22. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2012 Mar 4; 9 (4): 357–9.
23. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J Comput Biol*. 2012 May; 19 (5): 455–77.
24. Truong DT, Franzosa EA, Tickle TL, Scholz M, Weingart G, Pasolli E, et al. MetaPhlan2 for enhanced metagenomic taxonomic profiling. *Nat Methods*. 2015 Oct; 12 (10): 902–3.
25. Mättö J, Suihko ML, Saarela M. Comparison of three test media for antimicrobial susceptibility testing of bifidobacteria using the Etest method. *Int J Antimicrob Agents*. 2006 Jul; 28 (1): 42–8.

СЕРИН-ТРЕОНИНОВЫЕ ПРОТЕИНКИНАЗЫ БАКТЕРИЙ — ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ РЕГУЛЯЦИИ СОСТАВА МИКРОБИОТЫ ЧЕЛОВЕКА

Н. В. Захаревич¹✉, В. Н. Даниленко^{1,2}

¹ Лаборатория генетики микроорганизмов, Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова РАН, Москва

² Кафедра биоинформатики, факультет биологической и медицинской физики, Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный

Серин-треониновые протеинкиназы (СТПК) участвуют в передаче сигналов у бактерий, вовлечены в процессы роста и деления клетки, образование биопленок и формирование вирулентности. Они встречаются как у патогенных бактерий, так и у симбионтов микробиоты человека. Нами была разработана классификация СТПК грамположительных бактерий, в основе которой лежит сигнатура из 9 аминокислотных остатков, расположенных в области связывания аденина. На основе сигнатуры протеинкиназы и содержащие их роды и виды бактерий были разделены на 20 групп. Было выдвинуто предположение, что СТПК с одинаковой сигнатурой будут взаимодействовать со сходными низкомолекулярными веществами, которые могут быть использованы в качестве селективных ингибиторов СТПК для снижения скорости роста и вирулентности определенных групп бактерий кишечной микробиоты (КМ) человека. КМ, представленная более чем 400 видами бактерий, играет ключевую роль в поддержании гомеостаза организма человека. В норме состав КМ сбалансирован по видам и родам, но при различных заболеваниях таксономический баланс нарушается. Предполагается, что такого рода изменения могут являться триггерами заболеваний. В связи с этим разрабатываются различные подходы по регуляции состава микробиоты человека. В статье предложена концепция, основанная на использовании ингибиторов бактериальных СТПК в качестве «мягкой силы» для коррекции таксономического дисбаланса КМ, вызванного неинфекционными заболеваниями, а также для воздействия на патогенные микроорганизмы (снижения их вирулентности) при минимальном воздействии на протеинкиназы человека.

Ключевые слова: кишечная микробиота, серин-треониновые протеинкиназы, классификация, селективные ингибиторы, грамположительные бактерии

✉ **Для корреспонденции:** Захаревич Наталья Владимировна
ул. Губкина, д. 3, г. Москва, 119991; zakharevich@yandex.ru

Статья получена: 28.03.2017 **Статья принята к печати:** 07.04.2017

SERINE/THREONINE PROTEIN KINASES OF BACTERIA ARE POTENTIAL TARGETS FOR REGULATION OF HUMAN MICROBIOTA COMPOSITION

Zakharevich NV¹✉, Danilenko VN^{1,2}

¹ Laboratory of Bacterial Genetics, Vavilov Institute of General Genetics of RAS, Moscow, Russia

² Department of Bioinformatics, Faculty of Biological and Medical Physics, Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny

Serine/threonine protein kinases (STPKs) of bacteria are involved in signal transduction, cell growth and division, biofilm formation and virulence regulation. They are found in both pathogenic microbes and symbiotic residents of the human microbiota. Previously we proposed a classification scheme for STPKs of gram-positive bacteria based on the signature sequence of 9 amino acid residues in the ATP-binding pocket. Accordingly, protein kinases and bacterial species that contained those kinases were divided into 20 groups. We hypothesized that STPKs with identical signatures would interact with the same low-molecular-weight compounds that could be used as selective inhibitors of STPK to suppress growth and virulence of certain residents of the human gut microbiota (GM). GM represented by over 400 bacterial species is critical in maintaining homeostasis in the human body. In healthy individuals GT composition is balanced in terms of genera/species abundance. Shifts in the GT composition are thought to trigger pathology. In this connection various approaches are being developed to regulating the composition of the human microbiota. This article proposes the use of bacterial STPK inhibitors as “gentle” therapeutic agents for correcting taxonomic imbalances of GM triggered by non-infectious diseases and reducing virulence of pathogenic microbes with minimal impact on human protein kinases.

Keywords: gut microbiota, serine-threonine protein kinases, classification, selective inhibitors, gram-positive bacteria

✉ **Correspondence should be addressed:** Natalia Zakharevich
ul. Gubkina, 3, Moscow, Russia, 119991; zakharevich@yandex.ru

Received: 28.03.2017 **Accepted:** 07.04.2017

Взаимодействие кишечной микробиоты и организма хозяина

Микробиота человека — это эволюционно сложившееся сообщество микроорганизмов, обитающих в организме (на коже, в мочеполовой системе, желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) и т. д.) и являющихся его нормальным и необходимым компонентом. Микроорганизмы, составляющие микробиоту, являются симбионтами и поддерживают нормальное функционирование как организма хозяина, так и самого микробного сообщества. Самая крупная популяция микроорганизмов-симбионтов обитает в толстом отделе кишечника: в нем сконцентрировано около 60 % всей микрофлоры человека [1, 2]. Состав микробиоты и ее функции зависят от пола и возраста человека, характера питания, экологических и социальных условий жизни, а также от состояния здоровья человека и приема им различных лекарственных средств, в том числе антибиотиков [3, 4].

Микробиота, в частности, кишечная микробиота, способна существенно влиять на здоровье человека. Являясь основным резервуаром микроорганизмов, биоценоз тонкого и толстого отделов кишечника воздействует на работу не только ЖКТ, но и других жизненно важных органов и систем [1, 5]. Одной из наиболее значимых функций кишечной микробиоты является ее активное участие в формировании колонизационной резистентности организма хозяина. Эта функция выработалась в ходе длительного эволюционного взаимодействия человека и микроорганизмов, при котором шел непрерывный селективный отбор наиболее адаптированных бактериальных популяций. Помимо этого, кишечная микробиота способна активизировать иммунную, гормональную и нервную (включая мозг) системы хозяина. Иммуностимулирующая функция микробиоты обусловлена в первую очередь бифидобактериями и лактобациллами [1, 6]. Кишечная микробиота также участвует в синтезе биологически активных веществ — витаминов и гормонов; вовлечена в метаболизм белков, липидов, углеводов и нуклеиновых кислот; регулирует газовый состав кишечника и др. [4].

Изменения в кишечной микробиоте, вызванные внешними факторами, могут быть причиной дисбактериоза, характеризующегося увеличением числа потенциально патогенных организмов (патобионтов) [2, 7], а также могут приводить к возникновению различных метаболических и воспалительных заболеваний, висцеральных болей и даже опосредованных изменений в функционировании центральной нервной системы (ЦНС), которые, в свою очередь, могут быть причиной поведенческих и когнитивных нарушений [2, 8–10]. Также известно, что изменения в составе микробиоты кишечника часто сопутствуют таким заболеваниям, как ожирение, аллергия, диабет 2 типа, заболеваниям сердечно-сосудистой системы и аутоиммунным нарушениям [2, 11]. Число факторов, негативно воздействующих на состав и функционирование микробиоты человека, с каждым годом только возрастает: загрязнение окружающей среды (жизнь в мегаполисах) [12], неправильное питание (рост популярности фаст-фуда) [13], стрессы [14]. Известно также, что развитие дисбиотических расстройств кишечника может быть в большой степени обусловлено антибактериальной терапией, которая зачастую является причиной гибели ценной для человека симбионтной микрофлоры и стимулирует искусственную селекцию болезнетворных антибиотико-резистентных штаммов [1].

Симбиотические отношения между организмом хозяина и его микробиотой крайне важны. Микробное сообщество ЖКТ человека является чутким индикатором физиологического состояния организма хозяина, реагирующим на многие факторы [1, 4]. В связи с этим микробиота может быть рассмотрена в качестве потенциальной терапевтической мишени для лечения и/или коррекции различных патологий, в том числе дисбиотических состояний. Существуют различные подходы и стратегии по регуляции микробиома человека: диеты, употребление про- и пребиотиков, хирургические вмешательства. Некоторые авторы описывают положительное воздействие на состояние кишечной микробиоты физических нагрузок в сочетании с функциональной диетой [15, 16]. Мы предлагаем использовать селективные ингибиторы, воздействующие на отдельные бактериальные роды и/или даже виды, — замедляющие рост бактерий, снижающие вирулентность патогенных и условно-патогенных микроорганизмов и способствующие таким образом восстановлению таксономического состава кишечной микробиоты. Мишенью для таких ингибиторов у бактерий могут служить серин-треониновые протеинкиназы (СТПК) эукариотического типа.

Классификация СТПК грамположительных бактерий

Фосфорилирование и дефосфорилирование белка являются одними из основных механизмов регуляции различных молекулярных процессов в клетке. В среднем бактериальный фосфопротеом содержит порядка ста сайтов фосфорилирования. Заметным исключением, известным на сегодняшний день, является фосфопротеом *Mycobacterium tuberculosis*, содержащий около 500 сайтов [17]. Для эукариотических фосфопротеомов эти числа на порядок больше [18].

Как у бактерий, так и у человека серин-треониновые протеинкиназы являются одними из основных компонентов систем передачи сигналов [19, 20]. СТПК эукариотического типа были идентифицированы в бактериях [21–25] около 20 лет назад. На сегодняшний день известно, что они участвуют в регуляции таких важных процессов, как деление и рост клетки [26–28], образование биопленок [29], ответ на окислительный стресс [30], спорообразование [31]. СТПК играют важную роль в формировании вирулентности и патогенности у болезнетворных бактерий [21, 32, 33]. Эти ферменты также участвуют в патогенезе заболеваний, вызываемых различными микроорганизмами, например *M. tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* и др. [20, 25].

Молекулярный механизм ингибирования СТПК — это конкурентное взаимодействие веществ с сайтом связывания АТФ. По этой причине селективное ингибирование СТПК патогенных и условно-патогенных микроорганизмов АТФ-конкурентными ингибиторами представляет собой привлекательный подход по коррекции состава и функционального состояния микробиоты человека.

Ранее нами была предложена классификация СТПК эукариотического типа грамположительных бактерий [19]. В работе были рассмотрены СТПК различных групп микроорганизмов: патогенных и непатогенных представителей родов *Mycobacterium*, *Staphylococcus*, *Actinomyces* и др. и пробиотических представителей симбионтной микробиоты человека родов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*. В основу классификации лег анализ физико-химических свойств 9 аминокислотных остатков, экспонированных

в область связывания аденина. Аминокислотные остатки отбирали по результатам визуального анализа пространственных структур бактериальных СТПК, доступных в банке данных Protein Data Bank [34] и параллельно проводили анализ аминокислотных последовательностей бактериальных СТПК (в том числе было выполнено множественное выравнивание всех последовательностей бактериальных протеинкиназ) [19].

При анализе структур СТПК были идентифицированы аминокислотные остатки, взаимодействующие с АТФ. Особое внимание было уделено области связывания аденина — структурно более вариабельной по сравнению с областями связывания фосфата и рибозы. Неинформативные для классификации аминокислотные остатки, например консервативные для всех рассмотренных структур или вносящие вклад в связывание АТФ только атомами своей основной цепи, были исключены из рассмотрения. При анализе последовательностей СТПК грамположительных бактерий высококонсервативные аминокислотные остатки, характерные как для эукариотических, так и для бактериальных протеинкиназ, нами не рассматривались, а особое внимание было уделено заменам в консервативных для эукариотических киназ позициях, не влияющим на функциональность бактериальных киназ. При анализе последовательностей каталитических доменов бактериальных СТПК наше внимание также привлек V-субдомен (СТПК содержат 12 консервативных субдоменов, характерных как для эукариотических, так и для бактериальных СТПК [35, 36]). У эукариотических протеинкиназ V-субдомен — довольно вариабельная область по сравнению с другими субдоменами, не содержащая какого-либо консервативного мотива. Однако в V-субдоме расположены аминокислотные остатки, входящие в состав шарнирного участка, соединяющего две доли каталитического домена, и, меняя ориентацию каталитического и белок-связывающего участков, можно регулировать активность СТПК. В связи с этим V-субдомен, в частности, последовательность, относящаяся к шарнирному участку, представляет интерес для создания функциональной классификации СТПК.

Таким образом, по результатам визуального анализа структур СТПК и их аминокислотных последовательностей нами были отобраны 9 вариабельных аминокислотных остатков, боковые цепи которых экспонированы в область связывания аденина: Leu17, Val25, Ala38, Val72, Met92, Tyr94, Val95, Met145 и Met155 (остатки пронумерованы в соответствии с СТПК PknB *M. tuberculosis*) (рис. 1).

Выбранные остатки составили «сигнатуру» аденин-связывающего кармана. Консервативность рассматриваемых сигнатурных остатков различна. На основе анализа сигнатуры из 9 аминокислотных остатков и была проведена классификация СТПК грамположительных бактерий. По итогам классификации все киназы были разделены на 20 групп (рис. 2). Стоит отметить, что главным критерием группировки было наличие специфичной комбинации доноров/акцепторов водородной связи и ароматических остатков в конкретных положениях сигнатуры аденин-связывающего кармана. Тринадцать из 20 групп оказались родоспецифичными, а некоторые из оставшихся семи групп содержали представителей только патогенных микроорганизмов [19]. Таким образом, классификация СТПК также позволила разделить исследуемые бактериальные роды и виды на группы. Так как для каждой группы характерна специфичная конфигурация области связывания аденина (форма, объем и глубина области связывания), то было

выдвинуто предположение, что селективные ингибиторы, нацеленные на одну из групп, не будут (или будут очень слабо) взаимодействовать с киназами из других групп. В связи с этим, практически применением классификации может стать ее использование при разработке АТФ-конкурентных ингибиторов бактериальных СТПК эукариотического типа.

Возможности практического применения разработанной классификации: селективные ингибиторы СТПК

В настоящее время интенсивно изучается состав кишечной микробиоты. По предварительным оценкам, экосистема толстой кишки человека содержит более 400 видов бактерий, принадлежащих ограниченному числу таксономических групп [37, 38]. Как правило, представители таких бактериальных типов, как *Firmicutes*, *Bacteroides*, *Actinobacteria* и *Proteobacteria*, составляют значительную часть микробного сообщества, обитающего в кишечнике взрослого человека [39]. Однако для каждого индивида характерно, по-видимому, уникальное микробное сообщество [37, 40, 41], которое способно значительно меняться под воздействием различных эндо- и экзогенных факторов.

При различных дисбиотических состояниях снижается уровень пробиотической составляющей кишечной микробиоты и происходит рост патогенной микрофлоры, что приводит, в свою очередь, к различным патологиям [5]. На сегодняшний день показана взаимосвязь между микробиотой ЖКТ и многочисленными заболеваниями. Morgan и соавт., например, выявили корреляцию между дисбалансом кишечной микробиоты и такими заболеваниями, как язвенный колит и болезнь Крона [42]. В то время как у здоровых людей преобладают четыре основных бактериальных типа [37, 43], у пациентов с этими патологиями, во-первых, сокращается таксономическое разнообразие родов и видов, и, во-вторых, отмечается более низкая доля

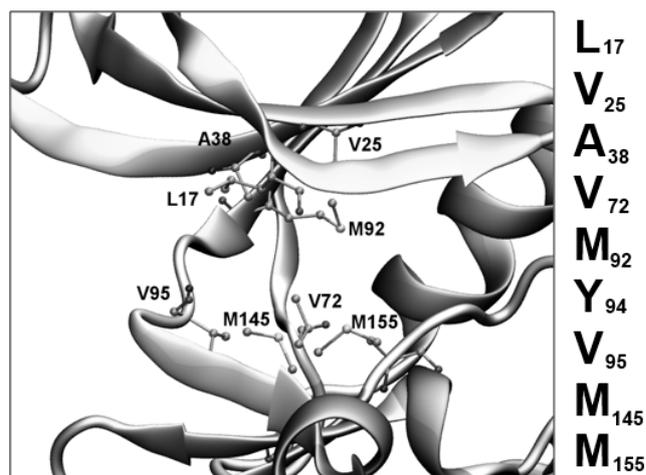


Рис. 1. На рисунке схематично представлена область связывания аденина, подписаны аминокислотные остатки, составляющие сигнатуру (Tyr94 на рисунке не виден). Первые три остатка расположены в глициновой петле (остатки 17–38) и формируют «потолок» аденин-связывающего кармана; остатки Val72, Met145 и Met155 формируют «пол» аденин-связывающего кармана. Последовательность шарнира состоит из остатков 92–96 (Met92 является остатком-«привратником» — gatekeeper), но остатки 93 и 96 участвуют в связывании лиганда только атомами главной цепи, вследствие чего были исключены из рассмотрения

(представленность) типа *Firmicutes*. Вдобавок при болезни Крона изменяются пропорции в представленности родов класса *Clostridia* [42, 44]. Исследования различных типов псориаза также показали снижение таксономического разнообразия в кишечной микробиоте при этом заболевании, причем изменения были ассоциированы с увеличением численности четырех бактериальных родов, в том числе *Corynebacterium*, *Staphylococcus* и *Streptococcus* [45].

Помимо этого, многочисленные данные свидетельствуют о наличии связи между различными метаболическими заболеваниями и изменениями в составе бактериальных популяций, населяющих ЖКТ. Так, в работе Larsen и соавт. были оценены различия между кишечной микрофлорой людей, страдающих диабетом 2 типа, и лиц без диабета [46]. Было установлено, что у диабетиков значительно снижено количество бактерий типа *Firmicutes* и класса *Clostridia* и повышено количество бактерий рода *Lactobacillus* по сравнению со здоровыми людьми [46]. Дело в том, что род *Lactobacillus* представляет собой гетерогенную группу микроорганизмов, обладающих иммуномодулирующими свойствами [47], которые, вероятно, и обуславливают воспаление у больных сахарным диабетом [46]. В исследованиях Тапа и соавт. у пациентов с синдромом раздраженного кишечника (СРК) также была выявлена достоверно более высокая численность бактерий рода *Lactobacillus*, чем у пациентов из контрольной группы [48]. Для пациентов с болезнью Крона и язвенным колитом, напротив, наличие ряда штаммов рода *Lactobacillus* необходимо. При исследованиях воспаленных образцов слизистых оболочек от пациентов с этими патологиями был обнаружен ряд необходимых микроорганизмов (в том числе рода *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*), которые способны фактически защищать слизистую оболочку ки-

шечника от различных воспалительных реакций, нежелательных для организма хозяина. Это связано с тем, что часть штаммов рода *Lactobacillus*, в частности, *L. casei* и *L. plantarum* подавляют экспрессию ключевых провоспалительных цитокинов и хемокинов и нейтрализуют провоспалительные эффекты, вызванные *Escherichia coli* [49].

Учитывая вышеописанное, для восстановления нормального таксономического состава микробиоты можно, используя разработанную классификацию, избирательно влиять, например, на группу бактерий рода *Lactobacillus* (XIII) [19] в случае диабета 2 типа и СРК или на группу бактерий родов *Corynebacterium*, *Staphylococcus* и *Streptococcus* (IV, X) при псориазе.

Кроме того, большинство СТПК являются ключевыми регуляторами роста бактерий: их ингибирование может приводить к замедлению роста микроорганизмов. Воздействуя селективными ингибиторами на группы СТПК, включающие СТПК симбионтов человека, можно менять состав кишечной микрофлоры человека, не убивая при этом «свои» микроорганизмы, а лишь замедляя их рост и функционирование. Примером такого воздействия может служить ингибирование роста бактерий, относящихся к группам III и IV разработанной классификации, — условно-патогенных представителей нормальной микрофлоры человека родов *Actinomyces* и *Corynebacterium* [19]. Таким образом, подбирая ингибиторы для СТПК определенных групп микроорганизмов, можно пытаться регулировать состав человеческой микробиоты.

Не стоит забывать, что не исключена возможность нецелевого ингибирования протеинкиназ человека в связи со структурным сходством участков связывания АТФ у человека и бактерий. Хотя идентичность каталитических доменов бактериальных и человеческих киназ обычно

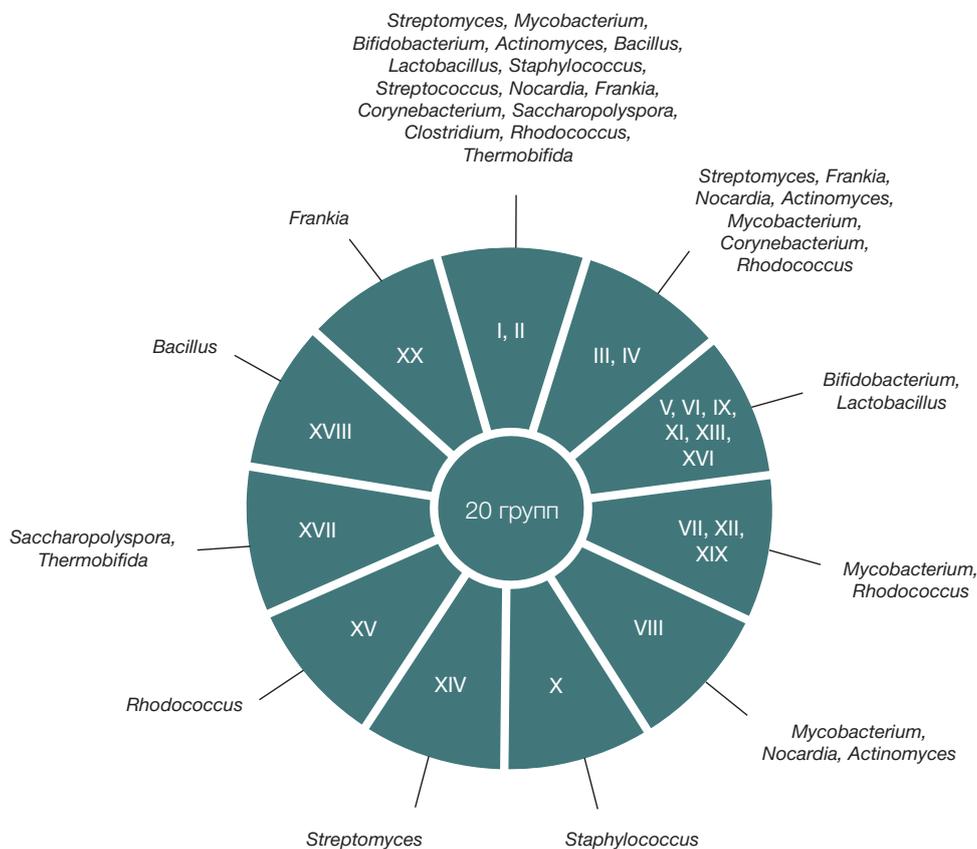


Рис. 2. Группы СТПК грамположительных бактерий (Zakharevich и соавт., [19])

составляет не более 30 %, следует обратить внимание на протеинкиназы человека при разработке селективных ингибиторов бактериальных СТПК. В человеческом киноме насчитывается порядка 518 протеинкиназ. При помощи множественного выравнивания нами было установлено, что 324 из них содержат «хэнковские домены», характерные для исследуемых нами СТПК эукариотического типа. Для распределения человеческих киназ по группам согласно разработанной классификации мы идентифицировали у отобранных 324 киназ 9 аминокислотных остатков, составляющих сигнатуру. По результатам проведенной работы оказалось, что человеческие киназы попадают только в 4 группы предложенной классификации: I, II, VIII и XII (рис. 3). Причем из всех рассмотренных человеческих протеинкиназ лишь 8,6 % попали в группы к бактериальным киназам. Стоит отметить, что ингибирование протеинкиназ человека, не попавших ни в одну из групп, ингибиторами, нацеленными на СТПК из рассматриваемых групп, кажется нам маловероятным в связи с различиями в их сайтах связывания.

Рассмотрим случай, при котором мы хотим получить селективные ингибиторы СТПК патогенных микроорга-

низмов. Такие ингибиторы должны быть избирательны не только по отношению к человеческим протеинкиназам, но и к СТПК микроорганизмов-симбионтов. Таким образом, необходимо разделить группы, содержащие СТПК патогенных микроорганизмов, СТПК симбионтов и протеинкиназы человека на три кластера и посмотреть, какие из групп характерны только для киназ патогенов. Для этого нами была построена диаграмма Венна (рис. 3).

На рис. 3 видно, что при разработке селективных ингибиторов СТПК патогенных микроорганизмов в первую очередь стоит обратить внимание на киназы из следующих четырех групп: VII, X, XVIII и XIX (таблица), — т. к. в них входят исключительно киназы патогенных микроорганизмов и вероятность взаимодействия ингибиторов, нацеленных на эти группы, с протеинкиназами человека или с СТПК бактерий-симбионтов будет минимальна.

В группы VII и XIX входят СТПК *M. tuberculosis*: PknK и PknI. PknK вовлечена в регуляцию трансляции на различных фазах роста, участвует в адаптивных механизмах и в патогенезе у микобактерий [50, 51]. Также экспериментально показано, что экспрессия *pknK* выше у вирулентного штамма *M. tuberculosis* H37Rv, чем у авирулентного

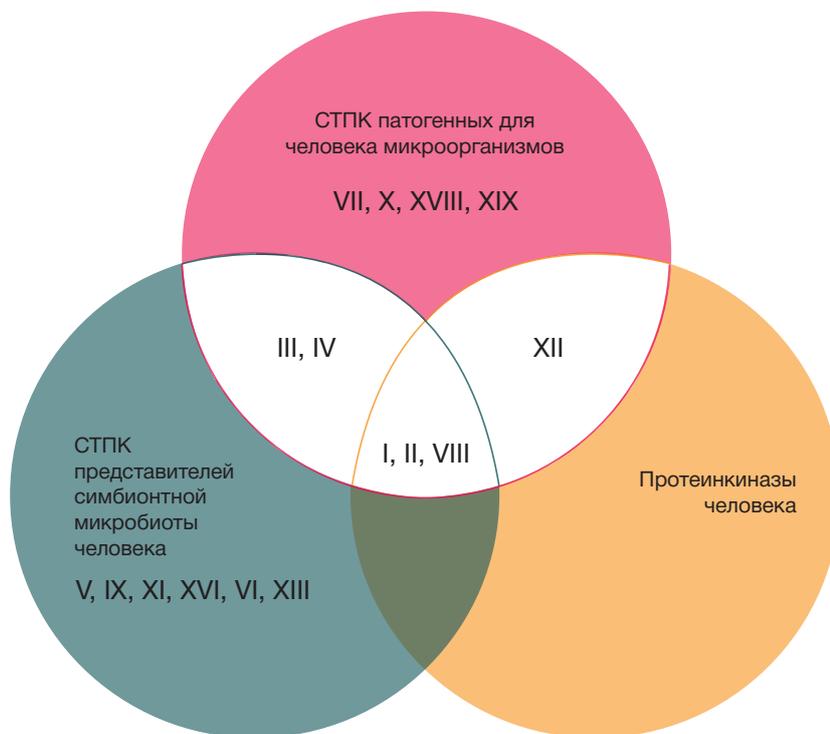


Рис. 3. Диаграмма Венна, демонстрирующая распределение групп серин-треониновых протеинкиназ (СТПК) по трем кластерам. Римскими цифрами обозначены группы согласно разработанной классификации (Zakharevich и соавт., [19]). Группы XIV, XV, XVII и XX отсутствуют на полученной диаграмме по двум причинам: во-первых, микроорганизмы, относящиеся к этим группам, не являются ни патогенами, ни представителями симбионтной микробиоты человека; во-вторых, не было обнаружено сходства между сигнатурами СТПК из четырех перечисленных групп и сигнатурами протеинкиназ человека

Характеристика СТПК из четырех групп (VII, X, XVIII, XIX), характерных для патогенных микроорганизмов

Группа	СТПК	Сигнатура	Род (вид)	Заболевания
VII, XIX	PknK, PknI	IV]VAVMYHLT, LSVVMYIVK	<i>Mycobacterium</i> (<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. ulcerans</i>)	Туберкулез, язвы Бурули, аквариумная гранулёма, различные оппортунистические инфекции
X	Stk (PknB)	LVAVMYILF	<i>Staphylococcus</i> (<i>S. aureus</i> , <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. epidermidis</i>)	Эндокардит, сепсис, перитонит, абсцессы, различные кожные инфекции
XVIII	YbdM	ITVPMYML[IV]	<i>Bacillus</i> (<i>B. weihenstephanensis</i> , <i>B. cytotoxicus</i>)	Пищевое отравление (диарея)

H37Ra [50]. PknI является близким гомологом киназы Stk1 *Streptococcus agalactiae*, участвующим в формировании вирулентности [52]. В связи с вышеизложенным можно предположить, что ингибирование данных киназ будет способствовать замедлению роста штаммов *M. tuberculosis* и снижению их патогенности и вирулентности.

В группу X входят СТПК рода *Staphylococcus*. СТПК стафилококков являются модуляторами структуры клеточной стенки, а также вовлечены в формирование вирулентности [53]. Таким образом, ингибирование киназ данной группы, так же, как и групп, описанных выше, будет способствовать уменьшению вирулентности штаммов *Staphylococcus*.

Группа XVIII представлена протеинкиназой рода *Bacillus* YbdM, которая фосфорилирует двухкомпонентную систему DegS/U. Эта система, в свою очередь, влияет на образование биопленок, формирование сложных колоний и подвижность микроорганизмов [54]. Следовательно, воздействие на эту группу СТПК селективными ингибиторами будет нарушать течение вышеописанных процессов.

Протеинкиназы человека, чьи сигнатуры совпали с сигнатурами бактериальных протеинкиназ, относятся к киназам из следующих классов: AGC¹, CAMK², CMGC³, STE⁴, — и к семействам протеинкиназ, не классифицированным на данный момент (например, семействам IKK и NEK). Роль этих протеинкиназ в организме человека различна. Например, киназы семейства ROCK участвуют в осуществлении ряда функций, в том числе Rho-индуцированного образования актиновых стрессорных волокон и очагов адгезии, а также в таких процессах, как активация тромбоцитов, сокращение гладкой мускулатуры различных органов, хемотаксис нейтрофилов и многих других [55]. PAK-киназы фосфорилируют и регулируют активность ряда цитоскелетных белков; также в ряде статей была описана их роль в регуляции активности MAPK в клетках млекопитающих [56, 57]. Для киназ семейства NDR описано участие в эмбриональном развитии, в нейробиологических процессах и биологии рака [58]. При этом нельзя однозначно сказать, что ингибирования указанных киназ человека следует избегать в любых случаях. Это не так, потому что, например, повышенная экспрессия ROCK-киназ ассоциирована с рядом заболеваний (раком мочевого пузыря, карциномой груди и др.), а с киназой PAK1 связаны такие заболевания суставов, как остеоартрит и ревматоидный артрит, т. к. активация ряда сигнальных путей, в которых данная киназа является одним из основных медиаторов, приводит к повышению экспрессии маркерных генов, имеющих отношение к остеоартриту [59].

Таким образом, регуляция таксономического состава человеческой микробиоты — это комплексная задача, требующая для своего решения привлечения специалистов из различных областей: для ее решения необходимо не

только хорошо понимать генетику микроорганизмов, но и разбираться в процессах, происходящих в клетках человека. Помимо этого, т. к. данная задача требует анализа большого массива данных и построения пространственных структур хотя бы для представителей основных групп киназ, необходимо участие биоинформатиков и химиков.

Выводы

В последнее время различные группы исследователей пришли к пониманию того, что микробиота человека чрезвычайно важна для его здоровья. Наиболее многочисленная и разнообразная по видовому составу популяция микроорганизмов сосредоточена в желудочно-кишечном тракте. Микроорганизмы, составляющие микробиоту ЖКТ, коэволюционируют с человеком. Нарушение таксономического баланса кишечной микробиоты может быть причиной различных патологий, в том числе язвенного колита, болезни Крона, диабета и др.

При разработке подходов по восстановлению таксономического состава микробиоты необходимо сочетать эффективность и селективность предлагаемых соединений для ингибирования роста микроорганизмов. Стоит подчеркнуть, что коррекция таксономического дисбаланса включает воздействие не только на патогенные микроорганизмы, но и на микроорганизмы-симбиоты. Следовательно, требуется «мягкий» инструмент воздействия на кишечную микробиоту, который будет замедлять рост нежелательных групп бактерий, снижать вирулентность патогенной составляющей микрофлоры при заболеваниях и минимально затрагивать протеинкиназы человека. Таким инструментом могут стать предлагаемые нами селективные ингибиторы бактериальных СТПК.

Сама идея использования направленных ингибиторов СТПК не нова [20, 60, 61]. Ранее, при сравнении киназ человека и различных паразитов (*Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Leishmania*), нами было показано, что, несмотря на довольно консервативную структуру каталитического домена и, в частности, сайтов связывания, разработка селективно действующих препаратов возможна [62]. Разработанная классификация СТПК является первым важным шагом на пути к созданию эффективных селективных ингибиторов бактериальных протеинкиназ.

Можно предложить следующий алгоритм разработки селективных ингибиторов СТПК: (1) сравнительный анализ таксономического состава микробиоты здорового и больного человека и выделение тех групп бактерий (родов и/или видов), количество которых возросло при патологии; (2) анализ групп, содержащих СТПК данных микроорганизмов; (3) *in silico* поиск ингибиторов (низкомолекулярных соединений) для протеинкиназ выделенных групп (моделирование пространственных структур, молекулярный докинг); (4) экспериментальная проверка предложенных соединений. При этом на этапах (2) и (3) также нужно будет учитывать следующее: информацию о функциях СТПК микроорганизмов-мишеней; СТПК бактерий, входящих в отобранные группы, но не являющихся мишенями; наличие предварительной пространственной структуры или даже нескольких структур для типичных представителей протеинкиназ из каждой группы для более быстрого отбора ингибирующих соединений.

¹ AGC — класс протеинкиназ, активность которых регулируется циклическим АМФ/ГМФ. Также в этот класс входят так называемые протеинкиназы С, активность которых может регулироваться диацилглицеролом, фосфолипидами и ионами кальция.

² CAMK — Са-кальмодулин-зависимые протеинкиназы.

³ CMGC — класс протеинкиназ, в который входят циклинзависимые протеинкиназы (С), так называемые MAP-киназы (М) и ферменты, способные фосфорилировать гликогенсинтазу (G).

⁴ STE — серин/треониновые киназы, первоначально идентифицированные в дрожжах.

Литература

1. Янковский Д. С. Состав и функции микробиоценозов различных биотопов человека. *Здоровье женщины*. 2003; 4 (16): 145–58.
2. Oriach CS, Robertson RC, Stanton C, Cryan JF, Dinan TG. Food for thought: The role of nutrition in the microbiota-gut-brain axis. *Clin Nutr Exp*. 2016; (6): 25–38.
3. Yatsunenkov T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012 May 9; 486 (7402): 222–7.
4. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 2015 Aug 7; 21 (29): 8787–803.
5. Аверина О. В., Даниленко В. Н. Микробиота кишечника человека: роль в становлении и функционировании нервной системы. *Микробиология*. 2017; 86 (1): 5–24.
6. Немаджата Р, Версалович Ж. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therap Adv Gastroenterol*. 2013 Jan; 6 (1): 39–51.
7. Kamada N, Chen GY, Inohara N, Núñez G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat Immunol*. 2013 Jul; 14 (7): 685–90.
8. DuPont AW, DuPont HL. The intestinal microbiota and chronic disorders of the gut. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011 Aug 16; 8 (9): 523–31.
9. Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev*. 2010 Jul; 90 (3): 859–904.
10. Cryan JF, Dinan TG. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci*. 2012 Oct; 13 (10): 701–12.
11. Maslowski KM, Mackay CR. Diet, gut microbiota and immune responses. *Nat Immunol*. 2011 Jan; 12 (1): 5–9.
12. Salim SY, Kaplan GG, Madsen KL. Air pollution effects on the gut microbiota: A link between exposure and inflammatory disease. *Gut Microbes*. 2014 Mar–Apr; 5 (2): 215–9.
13. Bested AC, Logan AC, Selhub EM. Intestinal microbiota, probiotics and mental health: from Metchnikoff to modern advances: part III — convergence toward clinical trials. *Gut Pathog*. 2013 Mar 16; 5 (1): 4.
14. Cryan JF, Dinan TG. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci*. 2012 Oct; 13 (10): 701–12.
15. Shetty SA, Hugenholtz F, Lahti L, Smidt H, de Vos WM. Intestinal microbiome landscaping: insight in community assemblage and implications for microbial modulation strategies. *FEMS Microbiol Rev*. 2017 Mar 1; 41 (2): 182–99.
16. Kang SS, Jeraldo PR, Kurti A, Miller MEB, Cook MD, Whitlock K, et al. Diet and exercise orthogonally alter the gut microbiome and reveal independent associations with anxiety and cognition. *Mol Neurodegener*. 2014 Sep 13; 9: 36.
17. Kobir A, Shi L, Boskovic A, Grangeasse C, Franjevic D, Mijakovic I. Protein phosphorylation in bacterial signal transduction. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Oct; 1810 (10): 989–94.
18. Ge R, Shan W. Bacterial Phosphoproteomic Analysis Reveals the Correlation Between Protein Phosphorylation and Bacterial Pathogenicity. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2011 Oct; 9 (4–5): 119–27.
19. Zakharevich NV, Osolodkin DI, Artamonova II, Palyulin VA, Zefirov NS, Danilenko VN. Signatures of the ATP-binding pocket as a basis for structural classification of the serine/threonine protein kinases of gram-positive bacteria. *Proteins*. 2012 May; 80 (5): 1363–76.
20. Danilenko VN, Osolodkin DI, Lakatosh SA, Preobrazhenskaya MN, Shtil AA. Bacterial eukaryotic type serine-threonine protein kinases: from structural biology to targeted anti-infective drug design. *Curr Top Med Chem*. 2011; 11 (11): 1352–69.
21. Av-Gay Y, Everett M. The eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases of *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol*. 2000 May; 8 (5): 238–44.
22. Leonard CJ, Aravind L, Koonin EV. Novel families of putative protein kinases in bacteria and archaea: evolution of the “eukaryotic” protein kinase superfamily. *Genome Res*. 1998 Oct; 8 (10): 1038–47.
23. Shi L, Potts M, Kennelly PJ. The serine, threonine, and/or tyrosine-specific protein kinases and protein phosphatases of prokaryotic organisms: a family portrait. *FEMS Microbiol Rev*. 1998 Oct; 22 (4): 229–53.
24. Petřicková K, Petřicek M. Eukaryotic-type protein kinases in *Streptomyces coelicolor*: variations on a common theme. *Microbiology*. 2003 Jul; 149 (Pt 7): 1609–21.
25. Cozzano AJ. Role of protein phosphorylation on serine/threonine and tyrosine in the virulence of bacterial pathogens. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2005; 9 (3–4): 198–213.
26. Molle V, Kremer L. Division and cell envelope regulation by Ser/Thr phosphorylation: *Mycobacterium* shows the way. *Mol Microbiol*. 2010 Mar; 75 (5): 1064–77.
27. Ruggiero A, De Simone P, Smaldone G, Squeglia F, Berisio R. Bacterial cell division regulation by Ser/Thr kinases: a structural perspective. *Curr Protein Pept Sci*. 2012 Dec; 13 (8): 756–66.
28. Elizarov SM, Mironov VA, Danilenko VN. Calcium-induced alterations in the functioning of protein serine/threonine and tyrosine kinases in *Streptomyces fradiae* cells. *IUBMB Life*. 2000 Aug; 50 (2): 139–43.
29. Hussain H, Branny P, Allan E. A eukaryotic-type serine/threonine protein kinase is required for biofilm formation, genetic competence, and acid resistance in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*. 2006 Feb; 188 (4): 1628–32.
30. Neu JM, MacMillan SV, Nodwell JR, Wright GD. StoPK-1, a serine/threonine protein kinase from the glycopeptide antibiotic producer *Streptomyces toyocaensis* NRRL 15009, affects oxidative stress response. *Mol Microbiol*. 2002 Apr; 44 (2): 417–30.
31. Madec E, Laszkiewicz A, Iwanicki A, Obuchowski M, Séror S. Characterization of a membrane-linked Ser/Thr protein kinase in *Bacillus subtilis*, implicated in developmental processes. *Mol Microbiol*. 2002 Oct; 46 (2): 571–86.
32. Rajagopal L, Vo A, Silvestroni A, Rubens CE. Regulation of cytotoxin expression by converging eukaryotic-type and two-component signaling mechanisms in *Streptococcus agalactiae*. *Mol Microbiol*. 2006 Nov; 62 (4): 941–57.
33. Wiley DJ, Nordfeldth R, Rosenzweig J, DaFonseca CJ, Gustin R, Wolf-Watz H, et al. The Ser/Thr kinase activity of the *Yersinia* protein kinase A (YpkA) is necessary for full virulence in the mouse, mollifying phagocytes, and disrupting the eukaryotic cytoskeleton. *Microb Pathog*. 2006 May; 40 (5): 234–43.
34. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*. 2000 Jan 1; 28 (1): 235–42.
35. Pereira SF, Goss L, Dworkin J. Eukaryote-like serine/threonine kinases and phosphatases in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2011 Mar; 75 (1): 192–212.
36. Hanks SK. Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome Biol*. 2003; 4 (5): 111.
37. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005 Jun 10; 308 (5728): 1635–8.
38. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *PLoS Biol*. 2007 Jul; 5 (7): e177.
39. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut Microbiome. *Nature*. 2011 May 12; 473 (7346): 174–80.
40. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JL. Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006 Dec 21; 444 (7122): 1022–3.
41. Zoetendal EG, Akkermans AD, De Vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 1998 Oct; 64 (10): 3854–9.
42. Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL,

- Ward DV, et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol.* 2012 Apr 16; 13 (9): R79.
43. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature.* 2012 Jun 13; 486 (7402): 207–14.
 44. Joossens M, Huys G, Cnockaert M, De Preter V, Verbeke K, Rutgeerts P, et al. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut.* 2011 May; 60 (5): 631–7.
 45. Statnikov A, Alekseyenko AV, Li Z, Henaff M, Perez-Perez GI, Blaser MJ, et al. Microbiomic Signatures of Psoriasis: Feasibility and Methodology Comparison. *Sci Rep.* 2013; 3: 2620.
 46. Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FWJ, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, et al. Gut Microbiota in Human Adults with Type 2 Diabetes Differs from Non-Diabetic Adults. *PLoS ONE.* 2010 Feb 5; 5 (2): e9085.
 47. Zeuthen LH, Christensen HR, Frøkiaer H. Lactic acid bacteria inducing a weak interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha response in human dendritic cells inhibit strongly stimulating lactic acid bacteria but act synergistically with gram-negative bacteria. *Clin Vaccine Immunol.* 2006 Mar; 13 (3): 365–75.
 48. Tana C, Umesaki Y, Imaoka A, Handa T, Kanazawa M, Fukudo S. Altered profiles of intestinal microbiota and organic acids may be the origin of symptoms in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil.* 2010 May; 22 (5): 512–9, e114–5.
 49. Manichanh C, Borruel N, Casellas F, Guarner F. The gut microbiota in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012 Oct; 9 (10): 599–608.
 50. Malhotra V, Arteaga-Cortés LT, Clay G, Clark-Curtiss JE. Mycobacterium tuberculosis protein kinase K confers survival advantage during early infection in mice and regulates growth in culture and during persistent infection: implications for immune modulation. *Microbiology.* 2010 Sep; 156 (Pt 9): 2829–41.
 51. Malhotra V, Okon BP, Clark-Curtiss JE. Mycobacterium tuberculosis Protein Kinase K Enables Growth Adaptation through Translation Control. *J Bacteriol.* 2012 Aug; 194 (16): 4184–96.
 52. Gopalaswamy R, Narayanan S, Chen B, Jacobs WR, Av-Gay Y. The serine/threonine protein kinase PknI controls the growth of Mycobacterium tuberculosis upon infection. *FEMS Microbiol Lett.* 2009 Jun; 295 (1): 23–9.
 53. Ohlsen K, Donat S. The impact of serine/threonine phosphorylation in Staphylococcus aureus. *Int J Med Microbiol.* 2010 Feb; 300 (2–3): 137–41.
 54. Jers C, Kobir A, Søndergaard EO, Jensen PR, Mijakovic I. Bacillus subtilis Two-Component System Sensory Kinase DegS Is Regulated by Serine Phosphorylation in Its Input Domain. *PLoS ONE.* 2011 Feb 3; 6 (2): e14653.
 55. Форстер К. Дж. (US), Эрност М. Дж. (US), Ван Ц. (US), Дэвис Р. Дж. (US), авторы; Вертекс Фармасьютикалз Инкорпорейтед (US), патентообладатель. Триазолы, используемые в качестве ингибиторов протеинкиназ. Патент РФ RU 2393155. 27 июня 2010 г.
 56. Потехина Е. С., Надеждина Е. С. Митоген-активируемые протеинкиназные каскады и участие в них Ste20-подобных протеинкиназ. *Успехи биол. хим.* 2002; 42: 235–56.
 57. Dan C, Nath N, Liberto M, Minden A. PAK5, a New Brain-Specific Kinase, Promotes Neurite Outgrowth in N1E-115 Cells. *Mol Cell Biol.* 2002 Jan; 22 (2): 567–77.
 58. Hergovich A, Stegert MR, Schmitz D, Hemmings BA. NDR kinases regulate essential cell processes from yeast to humans. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 Apr; 7 (4): 253–64.
 59. Клатт А. Р. (DE), Бартник Э. (DE), Чех Й. (DE), Леберер Э. (DE), Леойв Т. (DE), Баррадо С. (DE), авторы; Санофи-Авентис Дойчланд Гмбх (DE), патентообладатель. Применение ингибитора рак для лечения заболевания суставов. Патент РФ RU 2360696. 10 июля 2009 г.
 60. Wehenkel A, Bellinzoni M, Graña M, Duran R, Villarino A, Fernandez P, et al. Mycobacterial Ser/Thr protein kinases and phosphatases: physiological roles and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Jan; 1784 (1): 193–202.
 61. Cohen P. Protein kinases — the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov.* 2002 Apr; 1 (4): 309–15.
 62. Osolodkin DI, Zakharevich NV, Palyulin VA, Danilenko VN, Zefirov NS. Bioinformatic analysis of glycogen synthase kinase 3: human versus parasite kinases. *Parasitology.* 2011 May; 138 (6): 725–35.

References

1. Yankovsky DS. [Composition and Functions of Microbiocenoses in Varied Human Biotopes]. *Zdorov'e zhenshchiny.* 2003; 4 (16): 145–58. Russian.
2. Oriach CS, Robertson RC, Stanton C, Cryan JF, Dinan TG. Food for thought: The role of nutrition in the microbiota-gut-brain axis. *Clin Nutr Exp.* 2016; (6): 25–38.
3. Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature.* 2012 May 9; 486 (7402): 222–7.
4. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol.* 2015 Aug 7; 21 (29): 8787–803.
5. Averina OV, Danilenko VN. Human Intestinal Microbiota: Role in Development and Functioning of the Nervous System. *Microbiology.* 2017 Jan; 86 (1): 1–18.
6. Hemarajata P, Versalovic J. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therap Adv Gastroenterol.* 2013 Jan; 6 (1): 39–51.
7. Kamada N, Chen GY, Inohara N, Núñez G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat Immunol.* 2013 Jul; 14 (7): 685–90.
8. DuPont AW, DuPont HL. The intestinal microbiota and chronic disorders of the gut. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011 Aug 16; 8 (9): 523–31.
9. Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev.* 2010 Jul; 90 (3): 859–904.
10. Cryan JF, Dinan TG. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci.* 2012 Oct; 13 (10): 701–12.
11. Maslowski KM, Mackay CR. Diet, gut microbiota and immune responses. *Nat Immunol.* 2011 Jan; 12 (1): 5–9.
12. Salim SY, Kaplan GG, Madsen KL. Air pollution effects on the gut microbiota: A link between exposure and inflammatory disease. *Gut Microbes.* 2014 Mar–Apr; 5 (2): 215–9.
13. Bested AC, Logan AC, Selhub EM. Intestinal microbiota, probiotics and mental health: from Metchnikoff to modern advances: part III — convergence toward clinical trials. *Gut Pathog.* 2013 Mar 16; 5 (1): 4.
14. Cryan JF, Dinan TG. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci.* 2012 Oct; 13 (10): 701–12.
15. Shetty SA, Hugenholtz F, Lahti L, Smidt H, de Vos WM. Intestinal microbiome landscaping: insight in community assemblage and implications for microbial modulation strategies. *FEMS Microbiol Rev.* 2017 Mar 1; 41 (2): 182–99.
16. Kang SS, Jeraldo PR, Kurti A, Miller MEB, Cook MD, Whitlock K, et al. Diet and exercise orthogonally alter the gut microbiome and reveal independent associations with anxiety and cognition. *Mol Neurodegener.* 2014 Sep 13; 9: 36.
17. Kobir A, Shi L, Boskovic A, Grangeasse C, Franjevic D, Mijakovic I. Protein phosphorylation in bacterial signal transduction. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Oct; 1810 (10): 989–94.
18. Ge R, Shan W. Bacterial Phosphoproteomic Analysis Reveals the Correlation Between Protein Phosphorylation and Bacterial Pathogenicity. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2011 Oct; 9

- (4–5): 119–27.
19. Zakharevich NV, Osolodkin DI, Artamonova II, Palyulin VA, Zefirov NS, Danilenko VN. Signatures of the ATP-binding pocket as a basis for structural classification of the serine/threonine protein kinases of gram-positive bacteria. *Proteins*. 2012 May; 80 (5): 1363–76.
 20. Danilenko VN, Osolodkin DI, Lakatosh SA, Preobrazhenskaya MN, Shtil AA. Bacterial eukaryotic type serine-threonine protein kinases: from structural biology to targeted anti-infective drug design. *Curr Top Med Chem*. 2011; 11 (11): 1352–69.
 21. Av-Gay Y, Everett M. The eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases of *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol*. 2000 May; 8 (5): 238–44.
 22. Leonard CJ, Aravind L, Koonin EV. Novel families of putative protein kinases in bacteria and archaea: evolution of the “eukaryotic” protein kinase superfamily. *Genome Res*. 1998 Oct; 8 (10): 1038–47.
 23. Shi L, Potts M, Kennelly PJ. The serine, threonine, and/or tyrosine-specific protein kinases and protein phosphatases of prokaryotic organisms: a family portrait. *FEMS Microbiol Rev*. 1998 Oct; 22 (4): 229–53.
 24. Petříčková K, Petríček M. Eukaryotic-type protein kinases in *Streptomyces coelicolor*: variations on a common theme. *Microbiology*. 2003 Jul; 149 (Pt 7): 1609–21.
 25. Cozzzone AJ. Role of protein phosphorylation on serine/threonine and tyrosine in the virulence of bacterial pathogens. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2005; 9 (3–4): 198–213.
 26. Molle V, Kremer L. Division and cell envelope regulation by Ser/Thr phosphorylation: *Mycobacterium* shows the way. *Mol Microbiol*. 2010 Mar; 75 (5): 1064–77.
 27. Ruggiero A, De Simone P, Smaldone G, Squeglia F, Berisio R. Bacterial cell division regulation by Ser/Thr kinases: a structural perspective. *Curr Protein Pept Sci*. 2012 Dec; 13 (8): 756–66.
 28. Elizarov SM, Mironov VA, Danilenko VN. Calcium-induced alterations in the functioning of protein serine/threonine and tyrosine kinases in *Streptomyces fradiae* cells. *IUBMB Life*. 2000 Aug; 50 (2): 139–43.
 29. Hussain H, Branny P, Allan E. A eukaryotic-type serine/threonine protein kinase is required for biofilm formation, genetic competence, and acid resistance in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*. 2006 Feb; 188 (4): 1628–32.
 30. Neu JM, MacMillan SV, Nodwell JR, Wright GD. StoPK-1, a serine/threonine protein kinase from the glycopeptide antibiotic producer *Streptomyces toyocaensis* NRRL 15009, affects oxidative stress response. *Mol Microbiol*. 2002 Apr; 44 (2): 417–30.
 31. Madec E, Laszkiewicz A, Iwanicki A, Obuchowski M, Séror S. Characterization of a membrane-linked Ser/Thr protein kinase in *Bacillus subtilis*, implicated in developmental processes. *Mol Microbiol*. 2002 Oct; 46 (2): 571–86.
 32. Rajagopal L, Vo A, Silvestroni A, Rubens CE. Regulation of cytotoxin expression by converging eukaryotic-type and two-component signaling mechanisms in *Streptococcus agalactiae*. *Mol Microbiol*. 2006 Nov; 62 (4): 941–57.
 33. Wiley DJ, Nordfeldth R, Rosenzweig J, DaFonseca CJ, Gustin R, Wolf-Watz H, et al. The Ser/Thr kinase activity of the *Yersinia* protein kinase A (YpkA) is necessary for full virulence in the mouse, mollifying phagocytes, and disrupting the eukaryotic cytoskeleton. *Microb Pathog*. 2006 May; 40 (5): 234–43.
 34. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*. 2000 Jan 1; 28 (1): 235–42.
 35. Pereira SF, Goss L, Dworkin J. Eukaryote-like serine/threonine kinases and phosphatases in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2011 Mar; 75 (1): 192–212.
 36. Hanks SK. Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome Biol*. 2003; 4 (5): 111.
 37. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005 Jun 10; 308 (5728): 1635–8.
 38. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *PLoS Biol*. 2007 Jul; 5 (7): e177.
 39. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut Microbiome. *Nature*. 2011 May 12; 473 (7346): 174–80.
 40. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JL. Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006 Dec 21; 444 (7122): 1022–3.
 41. Zoetendal EG, Akkermans AD, De Vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 1998 Oct; 64 (10): 3854–9.
 42. Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward DV, et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol*. 2012 Apr 16; 13 (9): R79.
 43. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012 Jun 13; 486 (7402): 207–14.
 44. Joossens M, Huys G, Cnockaert M, De Preter V, Verbeke K, Rutgeerts P, et al. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut*. 2011 May; 60 (5): 631–7.
 45. Statnikov A, Alekseyenko AV, Li Z, Henaff M, Perez-Perez GI, Blaser MJ, et al. Microbiomic Signatures of Psoriasis: Feasibility and Methodology Comparison. *Sci Rep*. 2013; 3: 2620.
 46. Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FWJ, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, et al. Gut Microbiota in Human Adults with Type 2 Diabetes Differs from Non-Diabetic Adults. *PLoS ONE*. 2010 Feb 5; 5 (2): e9085.
 47. Zeuthen LH, Christensen HR, Frøkiaer H. Lactic acid bacteria inducing a weak interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha response in human dendritic cells inhibit strongly stimulating lactic acid bacteria but act synergistically with gram-negative bacteria. *Clin Vaccine Immunol*. 2006 Mar; 13 (3): 365–75.
 48. Tana C, Umesaki Y, Imaoka A, Handa T, Kanazawa M, Fukudo S. Altered profiles of intestinal microbiota and organic acids may be the origin of symptoms in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil*. 2010 May; 22 (5): 512–9, e114–5.
 49. Manichanh C, Borrueal N, Casellas F, Guarner F. The gut microbiota in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012 Oct; 9 (10): 599–608.
 50. Malhotra V, Arteaga-Cortés LT, Clay G, Clark-Curtiss JE. *Mycobacterium tuberculosis* protein kinase K confers survival advantage during early infection in mice and regulates growth in culture and during persistent infection: implications for immune modulation. *Microbiology*. 2010 Sep; 156 (Pt 9): 2829–41.
 51. Malhotra V, Okon BP, Clark-Curtiss JE. *Mycobacterium tuberculosis* Protein Kinase K Enables Growth Adaptation through Translation Control. *J Bacteriol*. 2012 Aug; 194 (16): 4184–96.
 52. Gopalaswamy R, Narayanan S, Chen B, Jacobs WR, Av-Gay Y. The serine/threonine protein kinase PknL controls the growth of *Mycobacterium tuberculosis* upon infection. *FEMS Microbiol Lett*. 2009 Jun; 295 (1): 23–9.
 53. Ohlsen K, Donat S. The impact of serine/threonine phosphorylation in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*. 2010 Feb; 300 (2–3): 137–41.
 54. Jers C, Kobir A, Søndergaard EO, Jensen PR, Mijakovic I. *Bacillus subtilis* Two-Component System Sensory Kinase DegS Is Regulated by Serine Phosphorylation in Its Input Domain. *PLoS ONE*. 2011 Feb 3; 6 (2): e14653.
 55. Forster KDzh (US), Ernost MDzh (US), Van Ts (US), Devis RDzh (US), inventors; Vertex Pharmaceuticals Inc. (US), assignee. Triazoles used as protein kinase inhibitors. Russian Federation patent RU 2393155. 2010 Jun 27.
 56. Potekhina ES, Nadezhkina ES. Mitogen-aktiviruemye proteinkinaznye kaskady i uchastie v nikh Ste20-podobnykh proteinkinaz. *Uspekhi biologicheskoi khimii*. 2002; 42: 235–56. Russian.
 57. Dan C, Nath N, Liberto M, Minden A. PAK5, a New Brain-Specific Kinase, Promotes Neurite Outgrowth in N1E-115 Cells. *Mol Cell Biol*. 2002 Jan; 22 (2): 567–77.
 58. Hergovich A, Stegert MR, Schmitz D, Hemmings BA. NDR kinases regulate essential cell processes from yeast to humans.

- Nat Rev Mol Cell Biol. 2006 Apr; 7 (4): 253–64.
59. Klatt AR (DE), Bartnik E (DE), Chekh I (DE), Leberer E (DE), Leoiv T (DE), Barrado S (DE), inventors; Sanofi-Aventis Deutschland GmbH (DE), assignee. Application of pak inhibitor for arthropathy treatment. Russian Federation patent RU 2360696. 2009 Jul 10.
60. Wehenkel A, Bellinzoni M, Graña M, Duran R, Villarino A, Fernandez P, et al. Mycobacterial Ser/Thr protein kinases and phosphatases: physiological roles and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Jan; 1784 (1): 193–202.
61. Cohen P. Protein kinases — the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov*. 2002 Apr; 1 (4): 309–15.
62. Osolodkin DI, Zakharevich NV, Palyulin VA, Danilenko VN, Zefirov NS. Bioinformatic analysis of glycogen synthase kinase 3: human versus parasite kinases. *Parasitology*. 2011 May; 138 (6): 725–35.

ОСОБЕННОСТИ ПОДГОТОВКИ БИБЛИОТЕК ДЛЯ МЕТАГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ОБРАЗЦОВ НА ПЛАТФОРМЕ ILLUMINA

А. Ю. Красненко¹✉, А. Ю. Елисеев², Д. И. Борисевич¹, К. Ю. Цуканов¹, А. И. Давыдова¹, В. В. Ильинский¹

¹ ООО «Генотек», Москва

² Московская гимназия на Юго-западе № 1543, Москва

Метагеномное секвенирование, позволяющее определять таксономическую принадлежность и долю прокариотических организмов в сообществах в разных средах, широко используется не только в научной деятельности, но и в медицинской практике. В настоящее время для изучения микробиома человека применяется так называемое метагеномное секвенирование маркерных генов, при котором секвенируется не весь геном, а лишь те его регионы, по которым можно установить родовую и иногда видовую принадлежность микроорганизмов. Чаще всего для амплификации выбирают участки гена 16S рибосомальной РНК (16S рРНК), последовательность которого, с одной стороны, высококонсервативна, а с другой — содержит вариабельные участки, которые отличаются однонуклеотидными заменами в случае с разными микроорганизмами. При этом для амплификации таких участков генома возможен подбор универсальных праймеров, что значительно снижает стоимость и время исследования. Точность секвенирования в этом случае обеспечивается точностью подбора универсальных праймеров и оптимальностью условий проведения ПЦР на этапе подготовки библиотеки для секвенирования. В статье мы описываем подход к подбору универсальных праймеров и условий ПЦР для амплификации регион-специфической части V3 и V4 участков гена 16S рРНК для дальнейшего секвенирования образцов на платформах Illumina.

Ключевые слова: микробиом, метагеномное секвенирование, рибосомальная РНК, 16S рРНК, полимеразная цепная реакция, универсальные праймеры, библиотеки для секвенирования, двойное баркодирование

Благодарности: авторы благодарят Дарью Плахину и Ивана Стеценка из ООО «Генотек» за помощь в работе, а также Сергея Глаголева из Московской гимназии на Юго-Западе № 1543 — за ценные советы и замечания.

✉ **Для корреспонденции:** Красненко Анна Юрьевна
Наставнический пер., 17, стр. 1, подъезд 14, г. Москва, 105120; annakrasnenko@gmail.com

Статья получена: 12.04.2017 **Статья принята к печати:** 24.04.2017

METAGENOMIC LIBRARY PREPARATION FOR ILLUMINA PLATFORM

Krasnenko AY¹✉, Eliseev AY², Borisevich DI¹, Tsukanov KY¹, Davydova AI¹, Ilinsky VV¹

¹ Genotek Inc., Moscow, Russia

² Moscow South-West High School No. 1543, Moscow, Russia

Metagenomic sequencing is widely used in both scientific research and clinical practice for characterization of taxonomic profiles including estimation of relative abundance of prokaryotes in microbial communities in various media. Metagenomic sequencing of single marker genes is an excellent tool for studying the human microbiome. Unlike whole-genome sequencing, it targets those genome regions that can be instrumental in identification of microorganism species and genus. The 16S ribosomal RNA (16S rRNA) gene sequence is highly conserved but at the same time there are regions containing species-specific sequences that can discriminate between different bacteria and archaea. These regions can be amplified using universal primers, which makes the whole procedure more cost-effective and less time-consuming. Good primers and protocol design for PCR at the step of library preparation is crucial for achieving high data accuracy. Below we describe how to choose the optimal PCR protocol and universal primers to amplify V3 and V4 regions of the 16S rRNA gene for further sample sequencing using Illumina platform.

Keywords: microbiome, metagenomic sequencing, ribosomal RNA, 16S rRNA, polymerase chain reaction, universal primers, library preparation, double barcode

Acknowledgements: the authors thank Daria Plakhina and Ivan Stetsenok of Genotek for their help and Sergey Glagolev of Moscow South-West High School No. 1543 for his valuable advice and comments.

✉ **Correspondence should be addressed:** Anna Krasnenko
Nastavnicheskiy per. 17, str. 1, pod. 14, Moscow, 105120; annakrasnenko@gmail.com

Received: 12.04.2017 **Accepted:** 24.04.2017

В человеческом организме существует несколько бактериальных сообществ: в ротовой полости, кишечнике, урогенитальном тракте и т. д. Совокупность микроорганизмов, находящихся в симбиозе с организмом-хозяином, называют микробиомом [1]. Изучение микробиомов человека

позволяет узнать, какие бактерии живут в нашем организме в норме и при развитии различных заболеваний [2].

В настоящее время для исследования микробиома используется секвенирование регионов геномов бактерий, по которым можно установить родовую и иногда

видовую принадлежность микроорганизмов — метагеномное секвенирование маркерных генов, или метагеномное секвенирование [3]. Одними из наиболее удобных регионов для секвенирования являются участки гена 16S рибосомальной РНК (16S рРНК). Это связано с высокой консервативностью указанного гена в геномах всех прокариот, что делает возможным подбор универсальных праймеров для амплификации интересующих участков и уменьшение стоимости и времени исследования [4, 5]. В гене 16S рРНК можно выделить консервативные и варьируемые участки. Последние содержат однонуклеотидные замены, по которым можно определить видовую и/или родовую принадлежность микроорганизма путем сравнения обнаруженных в результате секвенирования замен с базой данных, составленной и обновляемой по литературным источникам.

Одним из основных этапов метагеномного секвенирования является подготовка образца для исследования, т. е. превращение исходного материала — нуклеиновой кислоты — в стандартную библиотеку фрагментов ДНК, подходящую для загрузки в секвенатор. При этом необходимо учитывать, что существует большое количество различных платформ секвенирования, и, хотя стратегии пробоподготовки во многом схожи, есть нюансы, обусловленные способом детекции сигнала в процессе секвенирования [6]. Основным шагом при подготовке образца является получение специфических фрагментов, в дальнейшем позволяющих определить видовую и/или родовую принадлежность микроорганизма. Чтобы получить точный результат методом метагеномного секвенирования, важно правильно подобрать праймеры, необходимые для наработки специфических ампликонов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) [7, 8]. В 2013 г. Klindworth и соавт. составили 512 пар праймеров, которые были разделены на несколько групп по типу технологии высокопроизводительного секвенирования (next generation sequencing, NGS): первая группа — для технологий Illumina и Ion Torrent (самые короткие продукты амплификации), вторая — для технологии 454 Life Science (средние по размеру продукты амплификации), третья — для технологий PacBio и др. и для создания колониальных библиотек (самые длинные продукты амплификации) [9]. В результате для каждой группы были найдены несколько пар праймеров для архей и бактерий, которые являются универсальными для дифференцировки разных родов и видов.

В статье мы рассматриваем особенности метагеномного секвенирования образцов на платформе Illumina, в первую очередь уделяя внимание подготовке библиотек для секвенирования, имеющей в случае с Illumina ряд особенностей [10]. Дело в том, что все процессы секвенирования на этой платформе проходят в проточной ячейке, покрытой одноцепочечными нуклеотидами, комплементарными последовательности адаптера, прикрепляемого во время приготовления библиотек. Прикрепленные к проточной ячейке фрагменты удлиняются при помощи ПЦР, при этом полимеразы начинают работать только в том случае, когда свободный конец связанного фрагмента гибридизуется с комплементарным олигонуклеотидом на поверхности ячейки. Вследствие этого происходит рост числа копий единичной молекулы в определенной части ячейки. Образуются миллионы кластеров, каждый из которых представляет собой скопление определенного фрагмента. После этого происходит распознавание последовательности: построение комплементарной цепи с использованием меченых нуклеотидов и снятие сигнала после каждого шага

удлинения. Описанная технология определяет особенности подготовки образцов к секвенированию, которые и были учтены в работе.

Подготовка библиотек для секвенирования на платформе Illumina

Образцы для исследования могут представлять собой биологический материал различных типов: слюна, ушная сера, соскоб со слизистой оболочки полости носа и т. д. В статье мы детально рассматриваем общий подход подготовки библиотек для секвенирования на платформе Illumina независимо от исследуемого образца. Описываемый подход включает несколько этапов: 1) выделение тотальной ДНК из образца; 2) определение участков для секвенирования и подбор праймеров для дальнейшей амплификации с помощью ПЦР (на этом этапе особое внимание уделяется качеству ПЦР, от которого зависит качество последующего секвенирования); 3) двойное баркодирование полученных библиотек для секвенирования; 4) секвенирование; 5) биоинформатический анализ полученных данных.

Существует большое количество протоколов и наборов реагентов для эффективного выделения тотальной ДНК [11] в зависимости от типа образца, поэтому мы не будем подробно останавливаться на обсуждении этой задачи. Контроль качества получаемой ДНК мы проводим с помощью электрофореза в агарозном геле, концентрацию определяем на приборе Qubit 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, США) по протоколу производителя [12].

После выделения тотальной ДНК проводится наработка необходимых участков для секвенирования с помощью ПЦР. Нами были выбраны участки гена 16S рРНК, поскольку, как говорилось выше, последовательность гена позволяет подобрать универсальные праймеры. Качество получаемых фрагментов зависит от степени комплементарности праймеров к участкам гена 16S рРНК [13, 14]. Последовательности праймеров состоят из регион-специфичной части, которая комплементарна границам амплифицируемого региона, и синтетической части, некомплементарной специфичной части и предназначенной для последующей гибридизации адаптеров для секвенирования. Праймеры подбирают таким образом, чтобы как минимум четыре 3'-концевых нуклеотида не были комплементарны самому праймеру или праймеру в паре во избежание образования димеров праймеров. Даже единичное расхождение в комплементарности последних 3–4 нуклеотидов на 3'-конце праймера может значительно снизить эффективность ПЦР, в том числе при условии подбора оптимальной температуры отжига [15, 16].

Существует множество постоянно обновляемых баз данных, содержащих последовательности генов 16S рРНК микроорганизмов различных видов [17, 18] и позволяющих, в том числе с помощью специальных программ [19], самостоятельно подобрать универсальные праймеры. В своей работе мы выбрали последовательности универсальных пар праймеров к регион-специфической части V3 и V4 участков гена 16S рРНК [23]. В качестве синтетической части были выбраны последовательности комплементарные адаптерам двух типов: Nextera и Truseq (синтетическая часть каждого праймера предназначена для последующей гибридизации адаптеров) (табл. 1).

После подбора праймеров необходимо провести оптимизацию условий проведения ПЦР (подобрать концентрацию праймеров, концентрацию ДНК, оптимальную

Таблица 1. Универсальные пары праймеров, состоящие из регион специфической части V3 и V4 участков гена 16S рPHK и синтетической части, комплементарной адаптерам Nextera и Truseq

Тип адаптера	Последовательность праймера	
Nextera	прямой	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG
	обратный	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC
Truseq	прямой	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCCTACGGGNGGCWGCAG
	обратный	GTGACTGGAGTTCAGACGTTGGCTCTTCCGATCTGACTACHVGGGTATCTAATCC

температуру отжига, концентрацию Mg^{2+} , количество циклов и т. д.) для получения достаточного количества и качества необходимых ампликонов для дальнейшего секвенирования. Проверку качества ПЦР проводят с помощью электрофореза в агарозном геле. При оптимизации условий необходимо помнить об отрицательном и положительном контроле. В качестве отрицательного контроля чаще всего используют ту же ПЦР-смесь, что и для исследуемых образцов, только без добавления ДНК-матрицы. В качестве положительного контроля мы используем два образца ДНК: ДНК одного образца принадлежит бактериям рода *Rhizobium*, а другого — рода *Rhodococcus*.

На количество нарабатываемых ампликонов может влиять образование димеров праймеров во время ПЦР [20]. При этом образование димеров можно увидеть при проведении контроля в агарозном геле (рис. 1). Снизить образование димеров можно путем разбавления праймеров, добавляемых в реакцию, а также изменением температуры их отжига. Оптимальная температура отжига праймеров, кроме того, дает возможность получать наиболее чистый продукт, поскольку обеспечивает точное прикреплени праймера к участку ДНК. Современные приборы позволяют проводить ПЦР с использованием градиента температур, что позволяет подобрать оптимальную температуру отжига за один прогон. Для эффективного проведения ПЦР также важна концентрация ионов Mg^{2+} , поскольку они связываются с dNTP, праймерами, ДНК-матрицей и хелатирующими агентами (EDTA), которые могут присутствовать в буфере [21]. Известно, что активность полимеразы увеличивается при высокой концентра-

ции Mg^{2+} , однако при этом снижается точность полимеразы. Как правило, для подбора оптимальной концентрации ионов Mg^{2+} в реакционной смеси проверяют влияние концентрации в диапазоне от 1 до 4 мМ с шагом в разбавлении 0,5 мМ.

При подборе условий для ПЦР оказалось, что для амплификации регионов V3 и V4 16S рPHK больше подходят праймеры под адаптеры Nextera. Вероятно, это связано с уникальностью последовательности Nextera, которая не комплементарна участкам генома исследуемых бактерий, что исключает образование побочных продуктов. Оптимальные условия для проведения ПЦР на приборе Step One Plus (Applied Biosystems, США) представлены в табл. 2.

После получения необходимого фрагмента для секвенирования проводят двойное баркодирование (индексирование) библиотек также с помощью метода ПЦР. Баркодирование — это «пришивание» последовательности, несущей индекс длиной восемь нуклеотидов и необходимой для последующего различения образцов из одной пробы при секвенировании сразу нескольких образцов [22]. Стоит отметить, что существует множество наборов реагентов для баркодирования при секвенировании на приборах Illumina, например Nextera XT Index kit. В нашем случае олигонуклеотиды были синтезированы в компании «Евроген» (Россия). Подбор условий ПЦР при баркодировании показал, что эффективность реакции не зависит от чистоты ДНК-матрицы и предварительная очистка образцов не требуется. Нами были подобраны оптимальные условия ПЦР для праймеров-индексов Nextera (табл. 3), они представлены в табл. 4.

Необходимо отметить важность проведения контроля качества библиотек фрагментов ДНК во избежание получения ошибок на этапе секвенирования. Мы проводим контроль качества с помощью прибора Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, США) (рис. 2).

Секвенирование образцов

В данной статье мы не будем подробно разбирать особенности этапа секвенирования, поскольку оно проводится по стандартным протоколам компании-производителя [24, 25]. Мы проводим секвенирование образцов на приборе MiSeq компании Illumina согласно стандартным протоколам с парноконцевыми прочтениями длиной 250 п. н.

Биоинформатический анализ

Полученные прочтения обрабатываются и классифицируются в соответствии с базой данных рибосомальной систематики RDP (Мичиганский университет, США) версии 11.5 при помощи пакета RDPTools версии 2016-07-21 [26, 27]. Порог условной вероятности корректности классификации (параметр `-conf`) устанавливается равной 50 %

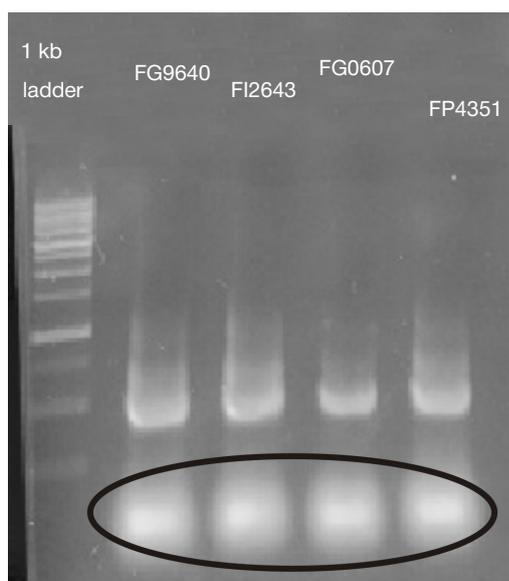


Рис. 1. Агарозный гель после проведения электрофореза с продуктами ПЦР. В первую лунку нанесен маркер длин ДНК, в остальные лунки — образцы. Черным овалом выделены димеры праймеров, образующиеся при постановке ПЦР

Таблица 2. Условия проведения полимеразной цепной реакции для амплификации V3 и V4 регионов с универсальными праймерами для адаптера Nextera

Состав	V, мкл	Протокол		
		T, °C	t, сек	Количество циклов
Прямой праймер (C = 1 мкМ)	5,0	95	180	1
Обратный праймер (C = 1 мкМ)	5,0	95	30	25
Тақ-полимераза	0,5	55	30	
dNTP	1,5	72	30	
ПЦР-буфер	2,5			
ДНК	2,5	72	300	1
mQ	8,0			

Таблица 3. Праймеры-индексы Nextera

Название праймера	Последовательность праймера
i701	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCGCCTTAGTCTCGTGGGCTCGG
i702	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTAGTACGGTCTCGTGGGCTCGG
i703	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTCTGCCTGTCTCGTGGGCTCGG
i704	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCTCAGGAGTCTCGTGGGCTCGG
i501	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTAGATCGCTCGTCGGCAGCGTC
i502	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTCTCTATTCTCGTCGGCAGCGTC
i503	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATCCTCTTCGTCGGCAGCGTC
i504	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAGAGTAGATCGTCGGCAGCGTC

Таблица 4. Условия проведения полимеразной цепной реакции для баркодирования для праймеров-индексов Nextera

Состав	V, мкл	Протокол		
		T, °C	t, сек	Количество циклов
Индекс 1 (C = 1 мкМ)	5,0	95	180	1
Индекс 2 (C = 1 мкМ)	5,0	95	30	10
Тақ-полимераза	0,5	55	30	
dNTP	1,5	72	30	
ПЦР-буфер	2,5			
Ампликоны из 1-й ПЦР	5,0	72	300	1
mQ	5,5			

в соответствии с рекомендуемыми параметрами запуска, указанными в [28].

Необходимо отметить важность проведения контроля качества секвенирования. Так, не менее 95 % последовательностей в каждом образце должны быть высокого качества, т. е. не должны содержать адаптерных и иных загрязняющих последовательностей, не картирующихся на геном человека. Кроме того, следует уделять особое внимание количеству прочтений для каждого образца при метагеномном секвенировании. Не существует стандартного значения для данного критерия: число прочтений, прежде всего, зависит от цели исследования. Так, если цель исследования заключается в оценке только основных типов бактерий в образце, то достаточно небольшого числа прочтений (например, в 22 образцах, взятых из кишечника человека, при количестве прочтений 350 можно обнаружить два основных типа бактерий: 75 % *Firmicutes* и 18 % *Bacteroidetes*) [4]. Однако следует помнить, что чем больше прочтений выбрано, тем более малочисленные микроорганизмы удастся обнаружить в образцах и тем незначительнее влияние ошибки сэмпирования. Для описания метагенома с высоким разрешением количество прочтений обычно составляет 10 000 и выше [4].

Значения доли последовательностей, которые не удалось классифицировать, доли последовательностей, классифицированных как «неизвестная бактерия», медианной доли последовательностей, для которых надежно определен род и семейство, должны соответствовать ожидаемым результатам для анализа микробиального метагенома методом 16S рПНК. Так, доля неопределенных ридов не должна превышать ~20 %, семейство должно

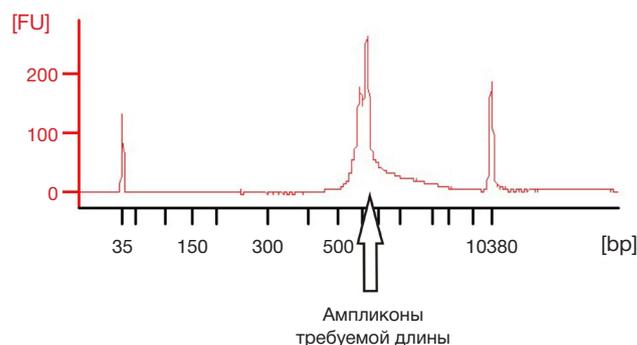


Рис. 2. Результат проверки качества библиотек для секвенирования на приборе Agilent Bioanalyzer 2100

Таблица 5. Вид представления результатов биоинформатического анализа

Rank	Name	rootrank	domain	phylum	class	order	family	genus	Sample 1	Sample 2	Sample ...
1_domain	Archaea	Root	Archaea								
2_phylum	Crenarchaeota	Root	Archaea	Crenarchaeota							
3_class	Thermoprotei	Root	Archaea	Crenarchaeota	Thermoprotei						
4_order	Acidilobales	Root	Archaea	Crenarchaeota	Thermoprotei	Acidilobales					
5_family	Acidilobaceae	Root	Archaea	Crenarchaeota	Thermoprotei	Acidilobales	Acidilobaceae				
6_genus	Acidilobus	Root	Archaea	Crenarchaeota	Thermoprotei	Acidilobales	Acidilobaceae	Acidilobus			

Примечание. Первый столбец Rank содержит таксономический уровень, второй столбец Name — название таксона. Эти столбцы предназначены для фильтрации данных. К примеру, управляя фильтром по столбцу Rank, можно получить представление результатов на уровне только видов, только родов и т. д. Следующие 7 столбцов (rootrank, domain, phylum, class, order, family, genus) содержат полный путь классификации таксона. Последние столбцы содержат данные об относительном содержании данного таксона в конкретном образце, в процентах. Название образцов указываются в заголовках столбцов.

определяться для ~70 % последовательностей и более, а род — для ~50 % и более. Однако, приведенные выше значения не являются стандартными и могут варьироваться от исследования к исследованию.

В результате анализа обычно формируется таблица, в которой указываются таксоны различного уровня (домен, тип, класс и т. д.) и содержится информация о таксономическом дереве и относительной представленности таксонов в каждом образце. Примером такой таблицы является табл. 5.

ВЫВОДЫ

При проведении метагеномного секвенирования участков гена 16S рРНК важным этапом является подбор праймеров для амплификации, поскольку от качества полученных

ампликонов зависит точность последующего секвенирования. В данной статье нами описан подход к подбору оптимальных условий ПЦР на стадии подготовки образца, позволяющий самостоятельно подобрать условия для проведения ПЦР на этапе подготовки библиотек, и основные проблемы этапа. Хотя существует достаточное количество публикаций, посвященные созданию библиотек для метагеномного секвенирования [29], нами разработан конкретный протокол, подобраны оптимальные условия для амплификации регионов V3 и V4 16S рРНК с универсальными праймерами для последующего секвенирования на платформе Illumina. Стоит отметить, что качество амплификации зависит от многих факторов, в том числе и от качества используемых реагентов, поэтому условия проведения ПЦР не могут быть универсальными и варьируются в зависимости от реагентов.

Литература

- Mori H, Maruyama F, Kato H, Toyoda A, Dozono A, Ohtsubo Y, et al. Design and Experimental Application of a Novel Non-Degenerate Universal Primer Set that Amplifies Prokaryotic 16S rRNA Genes with a Low Possibility to Amplify Eukaryotic rRNA Genes. *DNA Res.* 2014; 21 (2): 217–27.
- Deurenberg RH, Bathoorn E, Chlebowicz MA, Couto N, Ferdous M, Garcia-Cobos S, et al. Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *J Biotechnol.* 2017 Feb 10; 243: 16–24.
- Oulas A, Pavlodi C, Polymenakou P, Pavlopoulos GA, Papanikolaou N, Kotoulas G., et al. Metagenomics: tools and insights for analyzing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies. *Bioinform Biol Insights.* 2015 May 5; 9: 75–88.
- Hamady M, Knight R. Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges. *Genome Res.* 2009 Jul; 19 (7): 1141–52.
- Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, Glöckner FO, Ludwig W, Schleifer KH, et al. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat Rev Microbiol.* 2014 Sep; 12 (9): 635–45.
- Mardis ER. Next-generation sequencing platforms. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif).* 2013; 6: 287–303.
- Fabrice A, Didier R. Exploring microbial diversity using 16S rRNA high-throughput methods. *J Comput Sci Syst Biol.* 2009; 2 (1): 74–92.
- Schloss PD, Gevers D, Westcott SL. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. *PLoS ONE.* 2011; 6 (12): e27310.
- Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan 7; 41 (1): e1.
- Illumina Inc., интернет-сайт [официальная веб-страница]. c2017 [дата обращения: 10 апреля 2017 г.]. Next-Generation Sequencing (NGS) [дата обращения: 10 апреля 2017 г.]; [примерно 2 экрана]. Доступно по: <https://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html>
- Bag S, Saha B, Mehta O, Anbumani D, Kumar N, Dayal M, et al. An Improved Method for High Quality Metagenomics DNA Extraction from Human and Environmental Samples. *Sci Rep.* 2016 May 31; 6: 26775.
- Qubit 3.0 Fluorometer User Guide [файл из интернета]. Версия А.0. CLLA: Thermo Fisher Scientific Inc. c2014 [дата обращения: 10 апреля 2017 г.]; 67 с. Доступно по: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/qubit_3_fluorometer_man.pdf
- Polz MF, Cavanaugh CM. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Appl Environ Microbiol.* 1998 Oct; 64 (10): 3724–30.
- Reysenbach AL, Giver LJ, Wickham GS, Pace NR. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol.* 1992 Oct; 58 (10): 3417–8.
- Bru D, Martin-Laurent F, Philippot L. Quantification of the detrimental effect of a single primer-template mismatch by real-time PCR using the 16S rRNA gene as an example. *Appl Environ Microbiol.* 2008 Mar; 74 (5): 1660–3.
- Wu JH, Hong PY, Liu WT. Quantitative effects of position and type of single mismatch on single base primer extension. *J Microbiol Methods.* 2009 Jun; 77 (3): 267–75.

17. Seshadri R, Kravitz SA, Smarr L, Gilna P, Frazier M. CAMERA: a community resource for metagenomics. *PLoS Biol.* 2007 Mar; 5 (3): e75.
18. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan; 41 (Database issue): D590–6.
19. Mao D-P, Zhou Q, Chen C-Y, Quan Z-X. Coverage evaluation of universal bacterial primers using the metagenomic datasets. *BMC Microbiol.* 2012 May 3; 12: 66.
20. Brownie J, Shawcross S, Theaker J, Whitcombe D, Ferrie R, Newton C, et al. The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucleic Acids Res.* 1997 Aug 15; 25 (16): 3235–41.
21. Lorenz TC. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *J Vis Exp.* 2012 May 22; (63): e3998.
22. Kircher M, Sawyer S, Meyer M. Double indexing overcomes inaccuracies in multiplex sequencing on the Illumina platform. *Nucleic Acids Res.* 2012 Jan; 40 (1): e3.
23. 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation. Preparing 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons for the Illumina MiSeq System [файл из интернета]. [дата обращения: 10 апреля 2017 г.]: 28 с. Доступно по: https://www.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf
24. MiSeq System Denature and Dilute Libraries Guide [файл из интернета]. Сан-Диего: Illumina Inc.; c2016 [дата обращения: 10 апреля 2017 г.]: 14 с. Доступно по: http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system_documentation/miseq/miseq-denature-dilute-libraries-guide-15039740-01.pdf
25. Руководство по системе MiSeq [файл из интернета]. Сан-Диего: Illumina Inc.; c2015 [дата обращения: 10 апреля 2017 г.]: 106 с. Доступно по: http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system_documentation/miseq/translations/miseq-system-guide-15027617-01-rus.pdf
26. База данных рибосомальной систематики (RDP) [база данных в интернете]. Релиз 11. Ист-Лансинг, США: Мичиганский университет. c1992–2014 [дата обращения: 10 апреля 2017 г.]. Доступно по: <https://rdp.cme.msu.edu/>.
27. Collection of commonly used RDP Tools for easy building. На GitHub [хостинг проектов]. c2017 [дата обращения: 10 апреля 2017 г.]. Доступно по: <https://github.com/rdpstaff/RDPTools>
28. RDP extensible sequence classifier for fungal lsu, bacterial and archaeal 16s. На GitHub [хостинг проектов]. c2017 [дата обращения: 10 апреля 2017 г.]. Доступно по: <https://github.com/rdpstaff/classifier/tree/701e229dde7cbe53d4261301e23459d91615999d>
29. Jones MB, Highlander SK, Anderson EL, Li W, Dayrit M, Klitgord N, et al. Library preparation methodology can influence genomic and functional predictions in human microbiome research. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Nov 10; 112 (45): 14024–9.

References

1. Mori H, Maruyama F, Kato H, Toyoda A, Dozono A, Ohtsubo Y, et al. Design and Experimental Application of a Novel Non-Degenerate Universal Primer Set that Amplifies Prokaryotic 16S rRNA Genes with a Low Possibility to Amplify Eukaryotic rRNA Genes. *DNA Res.* 2014; 21 (2): 217–27.
2. Deurenberg RH, Bathoorn E, Chlebowicz MA, Couto N, Ferdous M, Garcia-Cobos S, et al. Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *J Biotechnol.* 2017 Feb 10; 243: 16–24.
3. Oulas A, Pavlouidi C, Polymenakou P, Pavlopoulos GA, Papanikolaou N, Kotoulas G., et al. Metagenomics: tools and insights for analyzing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies. *Bioinform Biol Insights.* 2015 May 5; 9: 75–88.
4. Hamady M, Knight R. Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges. *Genome Res.* 2009 Jul; 19 (7): 1141–52.
5. Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, Glöckner FO, Ludwig W, Schleifer KH, et al. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat Rev Microbiol.* 2014 Sep; 12 (9): 635–45.
6. Mardis ER. Next-generation sequencing platforms. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif).* 2013; 6: 287–303.
7. Fabrice A, Didier R. Exploring microbial diversity using 16S rRNA high-throughput methods. *J Comput Sci Syst Biol.* 2009; 2 (1): 74–92.
8. Schloss PD, Gevers D, Westcott SL. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. *PLoS ONE.* 2011; 6 (12): e27310.
9. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan 7; 41 (1): e1.
10. Illumina Inc., Web Site [homepage on the Internet]. c2017 [cited 2017 Apr 10]. Next-Generation Sequencing (NGS) [cited 2017 Apr 10]; [about 2 screens]. Available from: <https://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html>
11. Bag S, Saha B, Mehta O, Anbumani D, Kumar N, Dayal M, et al. An Improved Method for High Quality Metagenomics DNA Extraction from Human and Environmental Samples. *Sci Rep.* 2016 May 31; 6: 26775.
12. Qubit 3.0 Fluorometer User Guide [file on the Internet]. Revision A.0. US: Thermo Fisher Scientific Inc. c2014 [cited 2017 Apr 10]; 67 p. Available from: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/qubit_3_fluorometer_man.pdf
13. Polz MF, Cavanaugh CM. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Appl Environ Microbiol.* 1998 Oct; 64 (10): 3724–30.
14. Reysenbach AL, Giver LJ, Wickham GS, Pace NR. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol.* 1992 Oct; 58 (10): 3417–8.
15. Bru D, Martin-Laurent F, Philippot L. Quantification of the detrimental effect of a single primer-template mismatch by real-time PCR using the 16S rRNA gene as an example. *Appl Environ Microbiol.* 2008 Mar; 74 (5): 1660–3.
16. Wu JH, Hong PY, Liu WT. Quantitative effects of position and type of single mismatch on single base primer extension. *J Microbiol Methods.* 2009 Jun; 77 (3): 267–75.
17. Seshadri R, Kravitz SA, Smarr L, Gilna P, Frazier M. CAMERA: a community resource for metagenomics. *PLoS Biol.* 2007 Mar; 5 (3): e75.
18. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan; 41 (Database issue): D590–6.
19. Mao D-P, Zhou Q, Chen C-Y, Quan Z-X. Coverage evaluation of universal bacterial primers using the metagenomic datasets. *BMC Microbiol.* 2012 May 3; 12: 66.
20. Brownie J, Shawcross S, Theaker J, Whitcombe D, Ferrie R, Newton C, et al. The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucleic Acids Res.* 1997 Aug 15; 25 (16): 3235–41.
21. Lorenz TC. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *J Vis Exp.* 2012 May 22; (63): e3998.
22. Kircher M, Sawyer S, Meyer M. Double indexing overcomes inaccuracies in multiplex sequencing on the Illumina platform. *Nucleic Acids Res.* 2012 Jan; 40 (1): e3.
23. 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation. Preparing 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons for the Illumina MiSeq System [file on the Internet]. [cited 2017 Apr 10]; 28 p. Available from: https://www.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-

- metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf
24. MiSeq System Denature and Dilute Libraries Guide [file on the Internet]. San Diego: Illumina Inc.; c2016 [cited 2017 Apr 10]: 14 p. Available from: http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system_documentation/miseq/miseq-denature-dilute-libraries-guide-15039740-01.pdf
 25. Rukovodstvo po sisteme MiSeq [file on the Internet]. San Diego: Illumina Inc.; c2015 [cited 2017 Apr 10]: 106 p. Available from: http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system_documentation/miseq/translations/miseq-system-guide-15027617-01-rus.pdf. Russian.
 26. The Ribosomal Database Project (RDP) [database on the Internet]. Release 11. East Lansing, MI: Michigan State University. c1992–2014 [cited 2017 Apr 10]. Available from: <https://rdp.cme.msu.edu/>
 27. Collection of commonly used RDP Tools for easy building. In: GitHub [Git repository hosting service]. c2017 [cited 2017 Apr 10]. Available from: <https://github.com/rdpstaff/RDPTools>
 28. RDP extensible sequence classifier for fungal lsu, bacterial and archaeal 16s. In: GitHub [Git repository hosting service]. c2017 [cited 2017 Apr 10]. Available from: <https://github.com/rdpstaff/classifier/tree/701e229dde7cbe53d4261301e23459d91615999d>
 29. Jones MB, Highlander SK, Anderson EL, Li W, Dayrit M, Klitgord N, et al. Library preparation methodology can influence genomic and functional predictions in human microbiome research. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Nov 10; 112 (45): 14024–9.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОТОПА ЭЯКУЛЯТА И ЦЕРВИКАЛЬНОГО КАНАЛА МЕТОДОМ ПЦР-РВ С ТЕСТАМИ «АНДРОФЛОР» И «ФЕМОФЛОР» В СУПРУЖЕСКИХ ПАРАХ

Д. Г. Почерников¹✉, И. С. Галкина², Н. Т. Постовойтенко¹, А. М. Герасимов¹

¹ Ивановская государственная медицинская академия, Иваново

² Центральный научно-исследовательский институт организации и информатизации здравоохранения, Москва

Многие инфекции, передающиеся половым путем, вызываются бактериями. Роль ряда микроорганизмов в этиологии урогенитальных инфекций хорошо известна, однако далеко не всех. Во врачебном сообществе также принято считать, что микробиота урогенитального тракта у половых партнеров одинакова, в связи с чем им следует назначать одинаковое лечение. В данной статье сообщается о результатах исследования биотопа эякулята и цервикального канала в 50 супружеских парах, живших без барьерной контрацепции и приема антибактериальных препаратов не менее чем 3 месяца до участия в исследовании. Все пары обратились к врачу по поводу первичного или вторичного бесплодия, привычного невынашивания беременности или предгравидарной подготовки. Средний возраст мужчин составил $34,8 \pm 7,8$ лет, женщин — $30,4 \pm 6,2$ лет. Эякулят и отделяемое цервикального канала исследовали методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ) с использованием тестов «Андрофлор» (у мужчин) и «Фемофлор» (у женщин). В биотопе цервикального канала достоверно чаще, чем в биотопе эякулята, встречались *Lactobacillus spp.* ($p < 0,005$), *Eubacterium spp.* ($p = 0,002$), *Gardnerella vaginalis* ($p = 0,002$), *Megasphaera spp./Velionella spp./Dialister spp.* ($p = 0,004$). *Ureaplasma spp.* в 3 раза чаще встречалась у женщин, а *Mycoplasma hominis* — в 4 раза чаще у мужчин, но различия статистически недостоверны. В 4 (8 %) супружеских парах у обоих партнеров была абсолютно нормальная микрофлора эякулята и цервикального канала; в 23 (46 %) парах были выявлены совпадения между биотопами по одному и более микроорганизмам; также в 23 парах биотопы полностью не совпадали. Полученные данные указывают на необходимость обследовать обоих партнеров в паре для выбора эффективного лечения каждого из них. Метод ПЦР-РВ с тестами «Андрофлор» и «Фемофлор», являясь качественным и количественным, позволяет получить врачу все данные, необходимые для планирования терапии.

Ключевые слова: эякулят, цервикальный канал, урогенитальный тракт, супружеская пара, биотоп, микробиоценоз, микробиота, полимеразная цепная реакция, ПЦР-РВ, «Андрофлор», «Фемофлор»

✉ Для корреспонденции: Почерников Денис Геннадьевич
ул. Арсения, д. 53, кв. 44, г. Иваново, 153012; urologkmn@mail.ru

Статья получена: 08.04.2017 Статья принята к печати: 20.04.2017

A COMPARATIVE ANALYSIS OF SEMINAL AND VAGINAL MICROBIOTA OF MARRIED COUPLES BY REAL-TIME PCR WITH ANDROFLOR AND FEMOFLOR REAGENT KITS

Pochernikov DG¹✉, Galkina IS², Postovoytenko NT¹, Gerasimov AM¹

¹ Ivanovo State Medical Academy, Ivanovo, Russia

² Federal Research Institute for Health Organization and Informatics, Moscow, Russia

Many sexually transmitted diseases are caused by bacteria. While we fairly well understand the role of some microorganisms in the development of genitourinary tract infections, there is still a vast majority of those whose contribution is unclear. It is believed that sexual partners share their genitourinary microbiota, meaning that treatment regimens should be the same for both of them. This article reports results of the study of seminal and cervical microbial communities conducted in 50 married couples who did not use barrier birth control and did not take any antibiotics at least 3 months before the study. All couples presented with complaints of primary or secondary infertility, recurrent miscarriages or sought preconceptional counseling. The mean age of male and female participants was 34.8 ± 7.8 and 30.4 ± 6.2 years, respectively. Samples of the seminal fluid and vaginal secretions were studied by real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) with Androflor and Femoflor reagent kits. The following bacteria were more frequent in the vaginal microbiota than in the seminal fluid: *Lactobacillus spp.* ($p < 0.005$), *Eubacterium spp.* ($p = 0.002$), *Gardnerella vaginalis* ($p = 0.002$), *Megasphaera spp./Velionella spp./Dialister spp.* ($p = 0.004$). *Ureaplasma spp.* was 3 times more frequent in women, *Mycoplasma hominis* was 4 times more frequent in men; however, this difference was not significant. In 4 (8 %) couples both partners had normal microbiota; 23 (46 %) couples shared at least one microbiota resident. Also, microbial communities were totally different in 23 couples. The obtained data indicate that both sexual partners should be examined to decide on the most effective treatment for each of them. Qualitative and quantitative real-time PCR assays Androflor and Femoflor provide comprehensive data essential for adequate treatment planning.

Keywords: seminal fluid, cervical canal, genitourinary tract, married couple, microbiota, microbial community, polymerase chain reaction, real-time PCR, Androflor, Femoflor

✉ Correspondence should be addressed: Denis Pochernikov
ul. Arseniya, d. 53, kv. 44, Ivanovo, Russia, 153012; urologkmn@mail.ru

Received: 08.04.2017 Accepted: 20.04.2017

На сегодняшний день известно более 30 бактериальных инфекций, которые могут передаваться при половых контактах [1, 2]. Установлено, что такие микроорганизмы, как *Chlamydia trachomatis* и *Mycoplasma genitalium*, участвуют в развитии воспаления в мочеполовом тракте у мужчин и женщин, но до сих пор остается спорным вопрос о патогенности *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma spp.*, поэтому урогенитальные микоплазмы активно изучаются во всем мире [1–9].

Мета-анализ 4 712 научных статей, опубликованных в 1960–2013 гг., убедительно доказывает, что инфекционный процесс в урогенитальном тракте матери влияет на развитие осложнений беременности, таких как преждевременные роды, перинатальная заболеваемость и детская заболеваемость в раннем и отдаленном периоде [4]. Инфекции, передающиеся половым путем (ИППП), ухудшают качественные и количественные показатели спермограммы у мужчин, вызывают образование антиспермальных антител к сперматозоидам и являются одной из основных причин уретропростатита и бесплодия [1–3, 5–8, 10]. В одном из исследований по изучению микроорганизмов, встречающихся в амниотической жидкости у женщин с преждевременными родами, более чем в 50 % случаев была выявлена *Ureaplasma spp.*, но не в монокультуре, а, как правило, в ассоциации с условно-патогенными микроорганизмами: *Fusobacterium*, *Mycoplasma*, *Sneathia*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Leptotrichia*, *Peptostreptococcus*, *Gardnerella*, *Citrobacter*, *Lactobacillus spp.*, *Escherichia*, *Haemophilus* [9].

Распространенный в лабораторной практике метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) является качественным исследованием и позволяет быстро и достоверно определить возбудителей ИППП, но не позволяет идентифицировать сопутствующие условно-патогенные микроорганизмы. Однако современные клинические рекомендации указывают на важность определения не только вида возбудителя, но и его титра, в особенности это касается таких возбудителей, как *Ureaplasma spp.* и *M. hominis* [10–15]. По данным Европейской ассоциации урологов (European Association of Urology), диагностически значимый титр для *Ureaplasma urealyticum* — более 10^3 КОЕ/мл, это значение показателя влияет на выбор тактики ведения пациента [5]. Согласно отечественным клиническим рекомендациям при выявлении *Ureaplasma spp.* и/или *M. hominis* в количестве менее 10^4 КОЕ/мл и при отсутствии клинических и/или лабораторных признаков воспалительного процесса в мочеполовой системе лечение не проводится [11, 14, 15]. Современным критериям диагностики ИППП соответствует метод полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ) с использованием тестов «Андрофлор» у мужчин и «Фемофлор» у женщин, который является одновременно качественным и количественным.

Во врачебном сообществе и в обществе в целом сформировалось мнение о том, что в урогенитальных трактах половых партнеров присутствуют одинаковые микроорганизмы. Зачастую гинеколог или уролог после обнаружения инфекционного агента в мочеполовом тракте одного из супругов, в эякуляте или цервикальном канале, назначает лечение одновременно обоим партнерам, предполагая однообразие микроорганизмов в их половых трактах. В результате один из супругов остается необследованным и необоснованно получает такие же лекарственные препараты, что были назначены его половому партнеру. У нас

есть опыт обследования 117 семейных пар, живших без контрацепции, которым был выполнен бактериологический анализ эякулята и отделяемого цервикального канала, и в 84 % случаев бактериологические посевы не совпадали по видовому составу микроорганизмов [16]. В доступной нам литературе примеров сравнительного анализа биоценозов урогенитальных трактов супругов методом ПЦР-РВ найти не удалось.

Целью данного исследования являлся сравнительный анализ биотопа эякулята и отделяемого цервикального канала в супружеских парах методом ПЦР-РВ с использованием тестов «Андрофлор» и «Фемофлор».

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Нами проведено инициативное проспективное исследование 50 супружеских пар, обратившихся в клинику Ивановской государственной медицинской академии в период с октября 2016 г. по март 2017 г. по поводу первичного или вторичного бесплодия, привычного невынашивания беременности или предгравидарной подготовки. Все пары жили без использования барьерной контрацепции и приема антибактериальных препаратов как минимум три месяца перед забором материала. Средний возраст мужчин составил $34,8 \pm 7,8$ лет, женщин — $30,4 \pm 6,2$ лет.

Перед сбором эякулята мужчина полностью опорожнял мочевой пузырь, тщательно мыл руки с мылом, проходил туалет наружных половых органов с мылом и водой, после чего головка полового члена и крайняя плоть высушивалась стерильной салфеткой. Эякулят получали путем мастурбации, помещали в стерильный контейнер и доставляли в лабораторию в течение часа с момента забора. У женщин перед взятием материала из цервикального канала ватным тампоном удалялась слизь, затем шейка матки обрабатывалась стерильным физиологическим раствором. В цервикальный канал вводился зонд на глубину 0,5–1,5 см, при извлечении зонда исключалось его касание стенок влагалища. Обязательным условием перед осуществлением забора эякулята и соскоба эпителиальных клеток цервикального канала было воздержание супругов от половой жизни как минимум трое суток.

Все образцы биоматериала анализировали методом ПЦР-РВ с использованием наборов реагентов «Андрофлор» («НПО ДНК-Технология», Россия) и «Фемофлор» («НПО ДНК-Технология») и детектирующего амплификатора «ДТ-96» («НПО ДНК-Технология»).

Статистический анализ данных проводили с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel 2013 и Statistica 10.0 (StatSoft, США). Достоверность полученных данных анализировали с помощью критерия Фишера, различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

По результатам обследования с тестом «Андрофлор» у 16 (32 %) мужчин микроорганизмов в эякуляте обнаружено не было, у 7 (14 %) — в эякуляте присутствовала нормальная микрофлора, представленная условно-патогенными бактериями *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* и *Corynebacterium spp.*, у 27 (54 %) — был выявлен дисбиоз спермы. По результатам обследования с тестом «Фемофлор» у 11 (22 %) женщин в отделяемом цервикального канала было выявлено присутствие только *Lactobacillus spp.*, что соответствует критерию нормальной

микрофлоры цервикального канала, у 25 (50 %) — наблюдался дисбиоз отделяемого, у 14 (28 %) — была выявлена нормофлора, представленная *Lactobacillus spp.* > 80 %, факультативно-анаэробными и облигатно-анаэробными микроорганизмами при отсутствии внутриклеточных патогенов.

Видовой состав микроорганизмов в эякуляте и отделяемом цервикального канала, определенный с помощью тестов «Андрофлор» и «Фемофлор», представлен на рис. 1 и рис. 2 соответственно. У женщин во всех наблюдениях, кроме двух, была выявлена *Lactobacillus spp.*, у мужчин чаще всего встречалась *Corynebacterium spp.* (38 % наб-

людений), которая является представителем нормальной флоры эякулята. В цервикальном канале по сравнению со спермой достоверно чаще встречались *Lactobacillus spp.* ($p < 0,005$), *Eubacterium spp.* ($p = 0,002$), *Gardnerella vaginalis* ($p = 0,002$), *Megasphaera spp./Veillonella spp./Dialister spp.* ($p = 0,004$). Для данных о встречаемости других микроорганизмов статистически достоверных различий не выявили, но при этом *Ureaplasma spp.* встречалась у женщин в цервикальном канале в 3 раза чаще, чем в эякуляте (в 22 и 7 случаях соответственно), а *Mycoplasma hominis* — в 4 раза чаще у мужчин, чем у женщин (в 4 и 1 случае соответственно). У одной женщины и одного мужчины

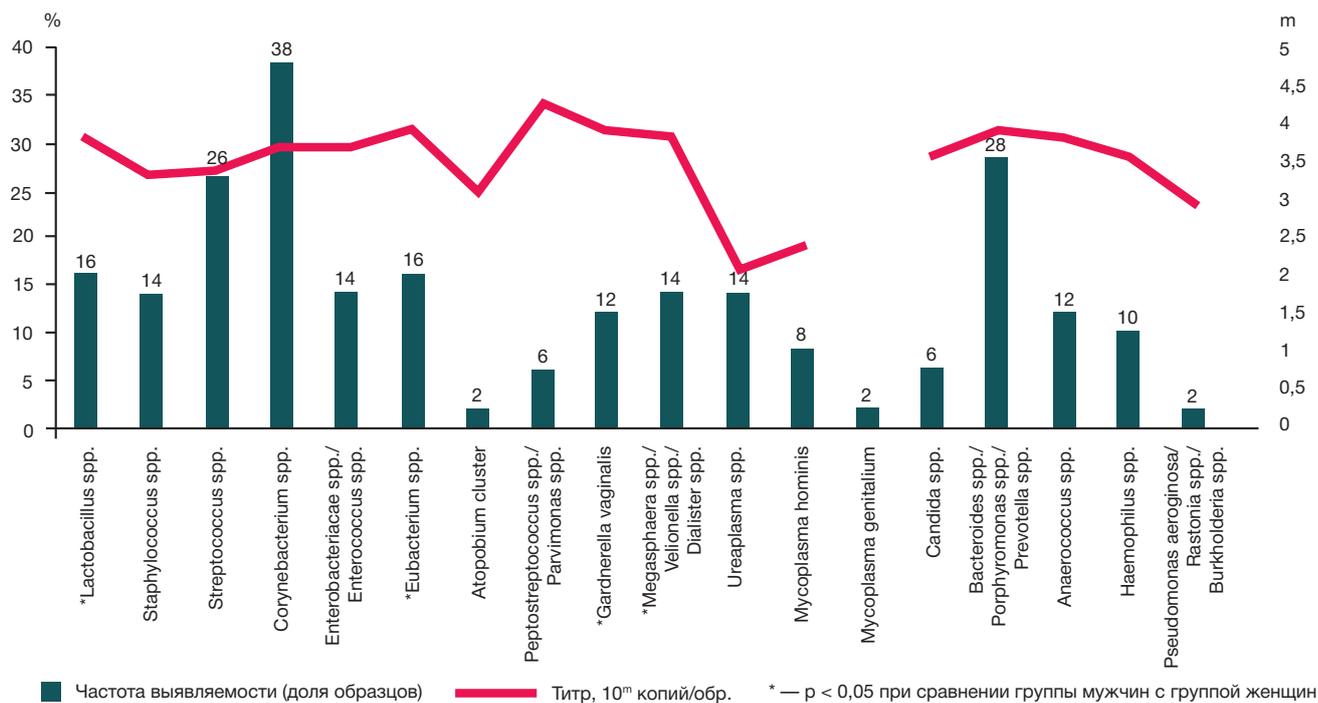


Рис. 1. Частота выявляемости (%) и средний титр (копий/обр.) микроорганизмов в эякуляте по результатам ПЦР-РВ с тестом «Андрофлор»

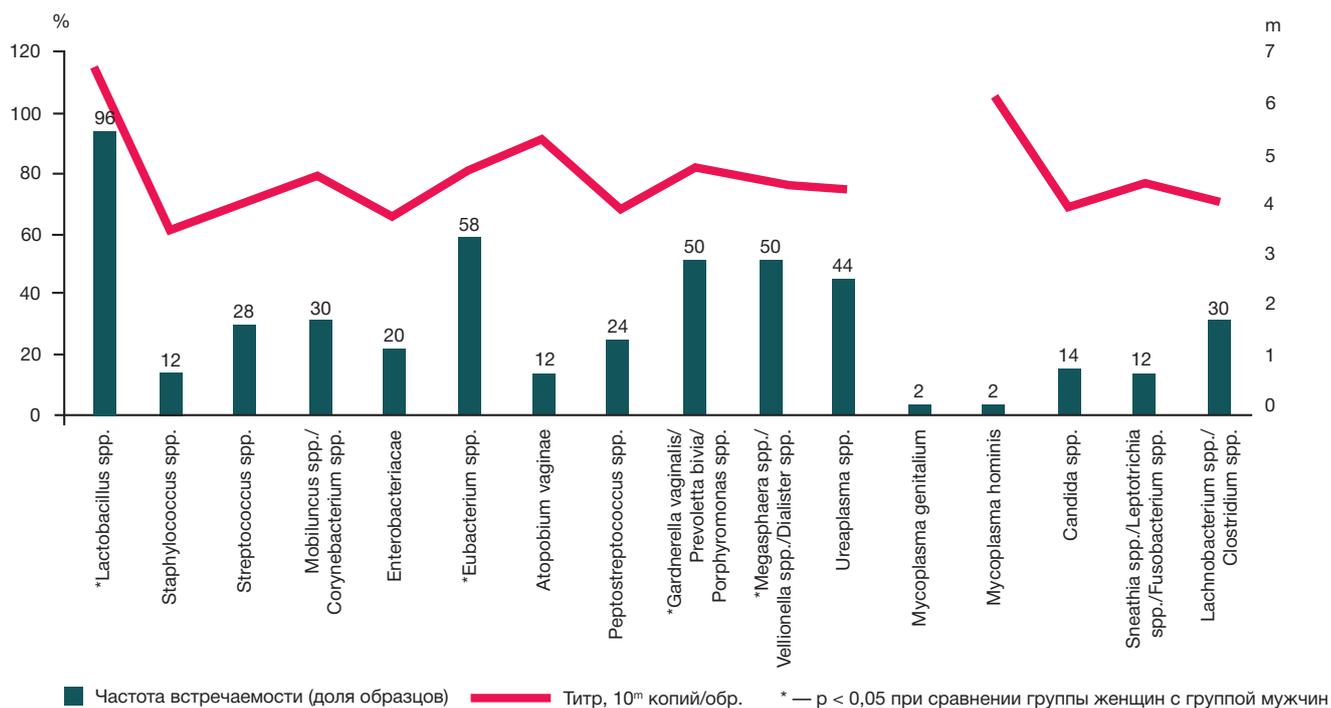


Рис. 2. Частота выявляемости (%) и средний титр (копий/обр.) микроорганизмов в цервикальном канале по результатам ПЦР-РВ с тестом «Фемофлор»

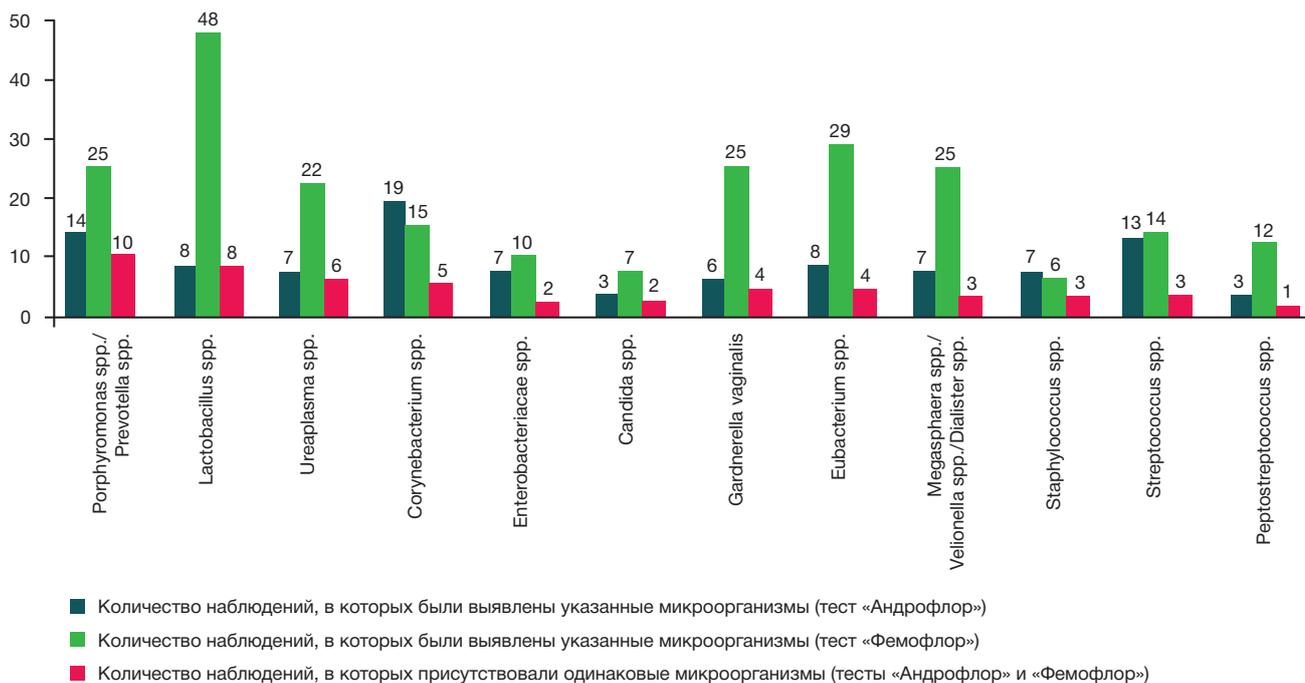


Рис. 3. Случаи совпадения биотопов эякулята и цервикального канала по видовому составу микроорганизмов

была выявлена *Mycoplasma genitalium*, при этом у их половых партнеров этот микроорганизм в пробах не присутствовал. Также наблюдали небольшое число случаев совпадения по видовому составу микроорганизмов у партнеров при высокой встречаемости одних и тех же микроорганизмов в одном из биотопов (рис. 3).

Оценивая в общем схожесть микробиоценозов эякулята и цервикального канала половых партнеров (рис. 4), необходимо отметить, что в 4 (8 %) супружеских парах у обоих партнеров была абсолютно нормальная микрофлора эякулята и цервикального канала; в 23 (46 %) парах были выявлены совпадения по одному и более микроорганизмам; и также в 23 парах биотопы эякулята и цервикального канала полностью не совпадали.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

ПЦР-РВ с тестами «Андрофлор» и «Фемофлор» дает возможность лечащему врачу в полной мере оценить микробиоту обоих партнеров в супружеской паре для эффективной диагностики нарушений их биоценозов (исследование эякулята и отделяемого цервикального канала). Одним из важных преимуществ теста «Андрофлор», на наш взгляд, является идентификация *Ureaplasma urealyticum* отдельно от биовара *Ureaplasma parvum*. Исследование показало присутствие в биотопе как эякулята, так и цервикального канала большого числа разных видов микроорганизмов, хотя в тестировании приняли участие относительно здоровые семейные пары, не предъявлявшие иных жалоб, кроме бесплодия. При сравнительном анализе результатов мужчин и женщин в половине пар биотопы партнеров не совпали, что подтверждает тезис об уникальности биоценозов супругов. В связи с этим врачам необходимо обратить внимание на необоснованность назначения одинаковой лекарственной терапии половым партнерам в отсутствие данных о видовом составе микробиоты и титре отдельных микроорганизмов для каждого из супругов.

ВЫВОДЫ

Проведенное исследование демонстрирует необходимость обследовать обоих половых партнеров в паре для эффективной диагностики дисбиоза урогенитального тракта. Для решения этой задачи хорошо подходит метод полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» с использованием наборов реагентов «Андрофлор» (для мужчин) и «Фемофлор» (для женщин). Это качественное и количественное исследование, которое позволяет определять в том числе титр микроорганизмов. Ориентируясь на данные, которые можно получить при исследовании рекомендуемым методом, врач сможет назначать этиотропную лекарственную терапию индивидуально каждому супругу.



Рис. 4. Структура наблюдений (n = 50) в зависимости от степени совпадения биотопов эякулята и цервикального канала в супружеских парах

Литература

- Хрянин А. А., Решетников О. В. Роль микоплазменной инфекции (*M. hominis* и *U. urealyticum*) в воспалительных заболеваниях мочеполовой системы — дискуссия продолжается. Урология. 2017; (2): 55–9.
- Прилепская В. Н., редактор. Инфекции, передающиеся половым путем. Клинические лекции. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2014. 160 с.
- Хрянин А. А., Решетников О. В. Микоплазменная инфекция. М.: ООО «Медиа Пресс»; 2011. 60 с.
- Chan GL, Lee AC, Baqui AH, Tan J, Black RE. Risk of early-onset neonatal infection with maternal infection or colonization: a global systematic review and meta-analysis. PLoS Med. 2013 Aug; 10 (8): e1001502.
- Jungwirth A, Diemer T, Dohle GR, Kopa Z, Krausz C, Tournaye H. EAU Guidelines on Male Infertility [файл из интернета]. The European Association of Urology; c2016 [дата обращения: 10 апреля 2017 г.]: 46 с. Доступно по: <https://uroweb.org/wp-content/uploads/EAU-Guidelines-Male-Infertility-2016-2.pdf>
- Божедомов В. А. Хронический простатит: новая парадигма лечения. Урология. 2016; (3 Прилож.): 78–90.
- Xia XY, An LM, Li WW, Li K, Shao Y, Shang XJ, et al. [Ureaplasma urealyticum infection affects sperm plasma membrane integrity in infertile men]. Zhonghua Nan Ke Xue. 2011 Dec; 17 (12): 1069–72. Chinese.
- Salmeri M, Valenti D, La Vignera S, Bellanca S, Morello A, Toscano MA, et al. Prevalence of Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis infection in unselected infertile men. J Chemother. 2012 Apr; 24 (2): 81–6.
- DiGiulio DB. Diversity of microbes in amniotic fluid. Semin Fetal Neonatal Med. 2012 Feb; 17 (1): 2–11.
- Щеплев П. А., редактор. Андрология. Клинические рекомендации. 2-е изд., доп. и перераб. М.: Медпрактика-М; 2012. 156 с.
- Яковлев С. В., Рафальский В. В., Сидоренко С. В., Спичак Т. В. Стратегия и тактика рационального применения antimicrobных средств в амбулаторной практике: Евразийские клинические рекомендации. М.: Пре100 Принт; 2016. 144 с.
- Кубанова А. А. Клинические рекомендации по ведению больных инфекциями, передаваемыми половым путем, и урогенитальными инфекциями. М.: Деловой Экспресс; 2012. 112 с.
- Рахматулина М. Р., Соколовский Е. В., Малова И. О., Серов В. Н., Аполихина И. А., Мелкумян А. Г. Федеральные клинические рекомендации по ведению больных хламидийной инфекцией. Акуш. и гин. 2016; (4 Прилож.): 57–63.
- Рахматулина М. Р., Соколовский Е. В., Малова И. О., Серов В. Н., Аполихина И. А., Мелкумян А. Г. Федеральные клинические рекомендации по ведению больных урогенитальными заболеваниями, вызванными *Mycoplasma genitalium*. Акуш. и гин. 2016; (4 Прилож.): 64–9.
- Перепанова Т. С., Козлов Р. С., Руднов В. А., Синякова Л. А. Антимикробная терапия и профилактика инфекций почек, мочевыводящих путей и мужских половых органов. Федеральные клинические рекомендации. М.: 2015. 72 с.
- Постовойтенко Н. Т., Почерников Д. Г., Герасимов А. М. Сравнительная оценка микробиоценоза цервикального канала и эякулята в супружеских парах с идиопатическим бесплодием. В сб.: Материалы межрегиональной научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Медико-биологические, клинические и социальные вопросы здоровья и патологии человека»; 11–15 апреля 2016 г.; Иваново, Россия. Т. 1. Иваново: ИвГМА; 2016. с. 138–9.

References

- Khryanin AA, Reshetnikov OV. [The role of Mycoplasma infection (*M. hominis* and *U. urealyticum*) in inflammatory diseases of the genitourinary system — the debate continues]. Urologiia. 2017; (2): 55–9. Russian.
- Prilepskaya VN, editor. Infektsii, peredayushchiesya polovym putem. Klinicheskie lektsii. Moscow: GEOTAR-Media; 2014. 160 p. Russian.
- Khryanin AA, Reshetnikov OV. [Mycoplasma infection]. Moscow: LLC “Media Press”; 2011. 60 p. Russian.
- Chan GL, Lee AC, Baqui AH, Tan J, Black RE. Risk of early-onset neonatal infection with maternal infection or colonization: a global systematic review and meta-analysis. PLoS Med. 2013 Aug; 10 (8): e1001502.
- Jungwirth A, Diemer T, Dohle GR, Kopa Z, Krausz C, Tournaye H. EAU Guidelines on Male Infertility [file on the Internet]. The European Association of Urology; c2016 [cited 2017 Apr 10]: 46 p. Available from: <https://uroweb.org/wp-content/uploads/EAU-Guidelines-Male-Infertility-2016-2.pdf>
- Bozhedomov VA. [Chronic prostatitis: a new paradigm of treatment]. Urologia. 2016 Aug; (3 Suppl): 78–90. Russian.
- Xia XY, An LM, Li WW, Li K, Shao Y, Shang XJ, et al. [Ureaplasma urealyticum infection affects sperm plasma membrane integrity in infertile men]. Zhonghua Nan Ke Xue. 2011 Dec; 17 (12): 1069–72. Chinese.
- Salmeri M, Valenti D, La Vignera S, Bellanca S, Morello A, Toscano MA, et al. Prevalence of Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis infection in unselected infertile men. J Chemother. 2012 Apr; 24 (2): 81–6.
- DiGiulio DB. Diversity of microbes in amniotic fluid. Semin Fetal Neonatal Med. 2012 Feb; 17 (1): 2–11.
- Shcheplev PA, editor. Andrologiya. Klinicheskie rekomendatsii. 2nd ed. Moscow: Medpraktika-M; 2012. 156 p. Russian.
- Yakovlev SV, Rafal'skii VV, Sidorenko SV, Spichak TV. Strategiya i taktika ratsional'nogo primeneniya antimikrobynykh sredstv v ambulatornoi praktike: Evrazijskie klinicheskie rekomendatsii. Moscow: Pre100 Print; 2016. 144 p. Russian.
- Kubanova AA. Klinicheskie rekomendatsii po vedeniyu bol'nykh infektsiyami, peredavaemymi polovym putem, i urogenital'nymi infektsiyami. Moscow: Delovoi Ekspres; 2012. 112 p. Russian.
- Rakhmatulina MR, Sokolovskii EV, Malova IO, Serov VN, Apolikhina IA, Melkumyan AG. Federal'nye klinicheskie rekomendatsii po vedeniyu bol'nykh khlamidiynoi infektsiei. Akusherstvo i ginekologiya. 2016; (4 Suppl): 57–63. Russian.
- Rakhmatulina MR, Sokolovskii EV, Malova IO, Serov VN, Apolikhina IA, Melkumyan AG. Federal'nye klinicheskie rekomendatsii po vedeniyu bol'nykh urogenital'nymi zabolovaniyami, vyzvannymi Mycoplasma genitalium. Akusherstvo i ginekologiya. 2016; (4 Suppl): 64–9. Russian.
- Perepanova TS, Kozlov RS, Rudnov VA, Sinyakova LA. Antimikrobnaya terapiya i profilaktika infektsii pochek, mochevyyvodyashchikh putei i muzhskikh polovykh organov. Federal'nye klinicheskie rekomendatsii. Moscow: 2015. 72 p. Russian.
- Postovoiitenko NT, Pochernikov DG, Gerasimov AM. Sravnitel'naya otsenka mikrobitsenoza tservikal'nogo kanala i eyakulyata v supruzheskikh parakh s idiopatcheskim besplodiem. In: Materialy mezhregional'noi nauchnoi konferentsii studentov i molodykh uchenykh s mezhdunarodnym uchastiem “Mediko-biologicheskie, klinicheskie i sotsial'nye voprosy zdorov'ya i patologii cheloveka”; 2016 Apr 11–15; Ivanovo, Russia. Vol. 1. Ivanovo: Ivanovo State Medical Academy; 2016. p. 138–9. Russian.

НОРМАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИКРОБИОЦЕНОЗА ВЛАГАЛИЩА: ОЦЕНКА С СУБЪЕКТИВНОЙ, ЭКСПЕРТНОЙ И ЛАБОРАТОРНОЙ ТОЧЕК ЗРЕНИЯ

Е. С. Ворошилина^{1,2} ✉, Д. Л. Зорников¹, Е. Э. Плотко^{2,3}

¹Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии, Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург

²Медико-фармацевтический центр «Гармония», Екатеринбург

³Кафедра акушерства и гинекологии, Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург

Критерии нормы для микробиоценоза влагалища здоровой женщины остаются предметом для дальнейшего изучения. Субъективный характер формирования группы «здоровых женщин» при проведении исследований не позволяет считать получаемые результаты однозначными. В данной работе мы сравнивали частоту встречаемости нормоценозов различных типов и дисбиоза влагалища у женщин, поделенных на группы в зависимости от характера их обследования (мнение женщины, осмотр врача, микроскопическое исследование). Были обследованы 234 женщины репродуктивного возраста из г. Екатеринбурга (средний возраст — $30,3 \pm 6,6$ лет). Оценку микробиоценоза и определение видового состава лактобацилл (*L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. vaginalis*) провели методом полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме «реального времени» с использованием тест-системы «Фемофлор» («НПО ДНК-Технология», Россия) и наборов реагентов для научного применения той же компании-производителя. У каждой пятой женщины репродуктивного возраста, считающей себя здоровой, был выявлен дисбиоз. Нормоценоз в этой группе чаще всего характеризовался преобладанием *L. iners*, а вариант нормоценоза с преобладанием *L. crispatus* определяли только у каждой третьей женщины. В то же время вариант нормоценоза с преобладанием *L. crispatus* был обнаружен у 46,2 % женщин, которые были отнесены к группе клинически здоровых на основании опроса, осмотра врача и микроскопического исследования. Это говорит о том, что клиническая оценка состояния нижних отделов гениталий без учета данных микроскопии носит субъективный характер и в ряде случаев не позволяет выявить у пациентки дисбиоз влагалища.

Ключевые слова: микробиоценоз влагалища, вагинальные лактобациллы, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus crispatus*, нормоценоз, дисбиоз

Благодарности: авторы благодарят Валерию Хаютина, директора Медико-фармацевтического центра «Гармония», за возможность выполнения исследования на базе центра.

✉ **Для корреспонденции:** Ворошилина Екатерина Сергеевна
ул. Фурманова, д. 30, г. Екатеринбург, 620142; voroshilina@gmail.com

Статья получена: 11.04.2017 **Статья принята к печати:** 20.04.2017

NORMAL VAGINAL MICROBIOTA: PATIENT'S SUBJECTIVE EVALUATION, PHYSICAL EXAMINATION AND LABORATORY TESTS

Voroshilina ES^{1,2} ✉, Zornikov DL¹, Plotko EE^{2,3}

¹Department of Microbiology, Virology and Immunology, Faculty of Preventive Medicine, Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russia

²Harmony Medical and Pharmaceutical Center, Yekaterinburg, Russia

³Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine and Healthcare, Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russia

Criteria of normality for the vaginal microbiota of healthy women are still a subject of discussion. A decision to assign a study participant to a group of healthy individuals is quite subjective if based on the absence of complaints and physical examination only, which renders study results ambiguous. Below we compare occurrence of the normal vaginal flora and vaginal dysbiosis in women divided into 3 groups according to the examination type (patient's subjective evaluation of her condition, physical examination, and laboratory tests). We examined 234 women of reproductive age from Yekaterinburg (mean age was 30.3 ± 6.6 years). Microbiota composition and lactobacillus diversity (*L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. vaginalis*) were evaluated by real-time polymerase chain reaction using the Femoflor assay and reagent kits by DNA-Technology, Russia. One in 5 women of reproductive age who had no health complaints was found to have dysbiosis. The normal microbiota of those women was dominated mostly by *L. iners*, while dominant *L. crispatus* were observed in every third participant. Prevailing *L. crispatus* were also found in the normal microbiota of 46.2 % of women who were considered healthy based on the doctor's examination and laboratory tests. Thus, clinical evaluation of the female lower reproductive tract can be compromised by doctor's subjectivity if not supported by laboratory tests and may overlook vaginal dysbiosis in the patient.

Keywords: vaginal microbiota, vaginal lactobacilli, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus crispatus*, normal vaginal flora, dysbiosis

Acknowledgements: the authors thank Valery Khayutin, Director of Harmony Medical and Pharmaceutical Center, for the opportunity to conduct the study at the Center's facilities.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ekaterina Voroshilina
ul. Furmanova, d. 30, Yekaterinburg, Russia, 620142; voroshilina@gmail.com

Received: 11.04.2017 **Accepted:** 20.04.2017

Определение критериев нормы для микробиоценоза влагалища здоровой женщины по-прежнему остается не до конца решенной задачей. При этом не всегда легко соотносить индивидуальную норму, характеризующую вариант микробиоценоза, обеспечивающий репродуктивное благополучие, с нормой популяционной. Последняя крайне зависима от дизайна исследования, т. к. описывает частоту встречаемости различных вариантов вагинальной микрофлоры у женщин, отобранных по определенным антропологическим, территориальным, возрастным, профессиональным и иным характеристикам.

В результате реализации проекта «Микробиом человека» (Human Microbiome Project) были накоплены обширные данные о состоянии вагинальной микрофлоры у женщин различных антропологических групп [1–6]. Исследования были проведены с использованием метода полногеномного секвенирования, что позволило установить все микроорганизмы, составляющие вагинальный микробиом. Для его описания ряд зарубежных авторов используют классификацию, учитывающую долю преобладающей группы микроорганизмов, а в случае доминирования лактофлоры (что рассматривают как показатель нормоценоза) — преобладающий вид лактобацилл [6]. В соответствии с этим подходом выделяют пять основных вариантов микробиоценоза сообщества, характерных для репродуктивного тракта женщин [6]:

1. вариант I — доминирование лактофлоры с преобладанием *Lactobacillus crispatus*,
2. вариант II — доминирование лактофлоры с преобладанием *L. gasseri*,
3. вариант III — доминирование лактофлоры с преобладанием *L. iners*,
4. вариант IV — дисбиотический тип с преобладанием облигатных анаэробов,
5. вариант V — доминирование лактофлоры с преобладанием *L. jensenii*.

Несмотря на то, что перечисленные варианты микробных сообществ выявляли у здоровых женщин всех антропологических групп, их частота встречаемости различалась в зависимости от принадлежности к той или иной группе. Так, среди афроамериканок и латиноамериканок в 40,6 и 38,1 % случаев встречался дисбиотический вариант IV. У представительниц этих групп достоверно выше частота самопроизвольного прерывания беременности, которую связывают с бактериальным вагинозом (БВ) — дисбиозом вагинальной микрофлоры. В то же время вариант I чаще выявляли у европеоидов — в 45,4 % случаев. Дисбиотический вариант микрофлоры не характерен для этой антропологической группы и был выявлен только у 10,3 % обследованных. Также было отмечено, что нормоценоз с преобладанием *L. crispatus* коррелирует с более низким уровнем pH вагинального отделяемого [6]. Повышенные протективные свойства данного вида лактобацилл связывают с высокой способностью к колонизации, более высоким уровнем продукции перекиси водорода и молочной кислоты [6–8]. Стоит отметить, подобный анализ в популяции россиянок не проводился.

В большинстве случаев для описания микробиома здоровых женщин отбирали группы asymptomatic women — женщин, считавших себя здоровыми. Однако наличие или отсутствие жалоб всегда субъективно, т. к. у пациентки нет образца для сравнения, а область приемлемого для индивидуума может существенно зависеть от культурного и образовательного уровня. Клиническая оценка состояния слизистой и отделяемого влагалища врачом также

является субъективной по определению. Поэтому принцип формирования группы нормы без привлечения объективных методов лабораторной диагностики может быть подвергнут критике. Насколько различается структура микробиоценоза влагалища в зависимости от критериев, использованных при формировании группы «здоровых женщин», неизвестно.

В России в 2008 г. был внедрен в клиническую практику тест «Фемофлор» (метод — полимеразная цепная реакция с детекцией результатов в режиме «реального времени», ПЦР-РВ), были разработаны критерии оценки вагинального микробиоценоза женщины [9]. С появлением возможности генотипировать вагинальные лактобациллы возникла потребность переосмыслить разработанные ранее критерии нормы.

Настоящее исследование было нацелено на выявление особенностей микробиоценоза влагалища и видового состава лактобацилл у женщин репродуктивного возраста, проживающих в г. Екатеринбурге и считающих себя здоровыми, в зависимости от способа формирования группы.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 234 женщины в возрасте от 18 до 45 лет (средний возраст — $30,3 \pm 6,6$ лет), обратившиеся в 2011–2015 гг. на амбулаторный прием к акушеру-гинекологу в Медицинский центр «Гармония» (Екатеринбург). Все женщины субъективно считали себя здоровыми, то есть не предъявляли жалоб, указывающих на инфекционно-воспалительную патологию влагалища. Критериями исключения были наличие облигатно патогенных возбудителей, передающихся половым путем, ВИЧ, гепатитов В и С; системная или местная антибиотикотерапия в течение предшествующих четырех недель.

Всех женщин обследовали однократно: оценивали состояние микробиоценоза влагалища с помощью метода ПЦР-РВ и тест-системы «Фемофлор-16» («НПО ДНК-Технология», Россия) и проводили количественный анализ 6 видов лактобацилл: *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. vaginalis*, — тем же методом, но с использованием набора реагентов для научного применения того же производителя.

Микроскопическое исследование мазка вагинального отделяемого проводили с окраской по Романовскому-Гимзе, состояние микробиоценоза оценивали в соответствии с классификацией, предложенной Е. Ф. Кира в 2001 г. [10].

Клиническую оценку состояния нижних отделов гениталий проводили методом опроса, всем женщинам был выполнен осмотр в зеркалах для объективной оценки состояния слизистой влагалища и характера выделений.

Полученные данные подвергли статистической обработке с использованием программы WinPeri. Для оценки достоверности различий по частоте выявления различных микробных сообществ между исследуемыми группами рассчитывали двусторонний критерий Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для достижения поставленной цели среди всех женщин, включенных в исследование (основная группа), выделили две подгруппы в соответствии с уточняющими критериями. В подгруппу 1 включили 125 женщин, у которых наряду с отсутствием субъективных жалоб по результатам

осмотра гинекологом не были выявлены признаки инфекционно-воспалительной патологии влагалища. В подгруппу 2 включили 52 женщины из подгруппы 1, у которых при отсутствии субъективных и объективных признаков патологии влагалища микроскопическая картина вагинального отделяемого соответствовала критериям нормоценоза [10].

В зависимости от доли нормофлоры, преобладающего вида лактобацилл и доли условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) мы выделили 5 вариантов микробных сообществ:

1. нормоценоз I — доминирование лактофлоры (доля *Lactobacillus spp.* более 80 % в общей массе микробов) с преобладанием *L. crispatus*,

2. нормоценоз II — доминирование лактофлоры с преобладанием *L. gasseri*,

3. нормоценоз III — доминирование лактофлоры с преобладанием *L. iners*,

4. нормоценоз IV — нормоценоз с преобладанием *L. jensenii/L. vaginalis*,

5. дисбиоз — доля лактофлоры менее 80 %, доля УПМ более 20 %.

Частота выявления различных вариантов нормоценоза и дисбиоза у обследованных групп женщин представлена на рис. 1.

Дисбиотический вариант микробиоценоза был выявлен у 19,7 % всех обследованных женщин ($n = 234$), а варианты нормоценоза были определены у 80 % обследованных женщин. Чаще других встречался вариант нормоценоза III (с преобладанием *L. iners*) — выявлен у 38,9% всех обследованных (рисунок). Вторым по частоте встречаемости был вариант нормоценоза I (с преобладанием *L. crispatus*) — обнаружен у 30,8% всех женщин, считавших себя здоровыми.

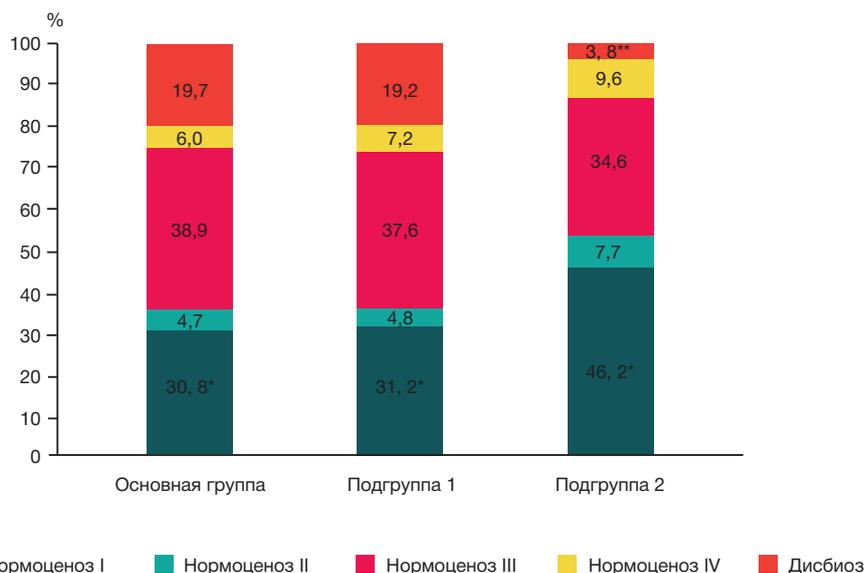
Анализ частоты встречаемости различных вариантов микробиоценоза влагалища среди женщин подгруппы 1 (клинически здоровых с точки зрения врача) не показал значимых отличий в сравнении с совокупностью обследованных женщин. Так, дисбиотический вариант был выявлен у 19,2 % женщин подгруппы, нормоценоз I — у 31,2 %, нормоценоз III — у 37,6 % женщин. Варианты нормоценоза II и IV встречались редко и среди всех обследованных, и в подгруппе 1.

Результаты в подгруппе 2 существенно отличались от результатов в основной группе и подгруппе 1: частота встречаемости дисбиотического варианта была почти в 5 раз ниже (3,8 % против 19,7 % в основной группе и 19,2 % в подгруппе 1, в обоих случаях $p < 0,01$). Также в подгруппе 2 была достоверно выше встречаемость нормоценоза с преобладанием *L. crispatus* — он был определен почти у половины обследованных женщин. Частота выявления прочих вариантов: нормоценоза II (с преобладанием *L. gasseri*) и нормоценоза IV (с преобладанием *L. jensenii/L. vaginalis*), — была несколько выше, а нормоценоза III (с преобладанием *L. iners*) — ниже по сравнению с другими группами, однако различия были статистически недостоверными, что, возможно, обусловлено малым числом женщин с данными вариантами нормоценоза.

Таким образом, у каждой пятой женщины, считавшей себя здоровой (основная группа), выявили вариант микробиоценоза влагалища, соответствующий критериям дисбиоза. Аналогичный результат получили и для тех женщин, которые были признаны клинически здоровыми после осмотра врача (подгруппа 1). Принципиально иную картину наблюдали в группе женщин, которых отнесли к категории здоровых на основании не только данных опроса и осмотра, но и результатов микроскопии (подгруппа 2). Почти в половине случаев у них был выявлен нормоценоз I — наиболее благоприятный вариант микробного сообщества с преобладанием *L. crispatus*, а дисбиотический вариант микробиоценоза встретился всего в нескольких случаях.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные в ходе настоящего исследования данные демонстрируют, что принцип формирования группы нормы существенно влияет на полученный результат и это необходимо учитывать при разработке дизайна подобных исследований. Восприятие своего здоровья женщиной, как и оценка ее состояния врачом, являются субъективными критериями. Ориентация на них без учета лабораторной оценки микробиоценоза влагалища может привести к гиподиагностике дисбиотических состояний и несвоевременной коррекции нарушений микробиоценоза влагалища, влияющих на репродуктивное здоровье женщины.



Частота выявления различных вариантов микробиоценоза влагалища у женщин, не имевших субъективных признаков инфекционно-воспалительной патологии влагалища (* — $p < 0,05$ и ** — $p < 0,01$ при сравнении между собой групп 1 и 3 и групп 2 и 3)

Частота выявления различных вариантов микробиоценоза влагалища у женщин различных антропологических групп, считавших себя здоровыми

Вариант микробиоценоза влагалища	Данные Ravel и соавт., 2011 (полногеномное секвенирование) [6]				Собственные данные (ПЦР-РВ)
	Европеоидная группа (n = 98)	Азиатская группа (n = 97)	Латиноамериканская группа (n = 97)	Афроамериканская группа (n = 104)	Россиянки, г. Екатеринбург (n = 234)
Нормоценоз I	45,4 %	25,0 %	14,4 %	22,1 %	30,8 %
Нормоценоз II	8,2 %	5,2 %	7,2 %	4,8 %	4,7 %
Нормоценоз III	26,8 %	42,7 %	36,1 %	31,5 %	38,9 %
Нормоценоз IV	9,3 %	7,3 %	4,2 %	1,0 %	6,0 %
Дисбиоз	10,3 %	19,8 %	38,1 %	40,6 %	19,7 %

В этой связи интересно сопоставить результаты, полученные нами, с данными, опубликованными Ravel и соавт. [6]. Они оценивали состояние микробиоценоза влагалища у женщин четырех антропологических групп (европеоидной, азиатской, латиноамериканской и афроамериканской), считавших себя здоровыми на момент обследования, несмотря на то, что некоторые из них не посещали врача на протяжении нескольких лет. В нашем исследовании по соответствующим критериям была сформирована группа 1. Данные сравнительного анализа представлены в таблице.

Микробиоценоз вагинального отделяемого обследованных нами женщин отличался от представительниц других антропологических групп, проживавших на момент обследования в США (исследование было проведено в клиниках Балтимора и Атланты). Мы сочли некорректным рассчитывать достоверность выявленных различий с учетом того, что были использованы разные методы оценки микробного сообщества. Тем не менее, результаты нашего исследования указывают на более высокую частоту обнаружения дисбиоза влагалища: почти в 2 раза выше по сравнению с европеоидной группой и сопоставимую с азиатской группой. Наиболее благоприятный вариант (нормоценоз I) выявляли у обследованных нами женщин в 1,5 раза реже по сравнению с европеоидной группой, но чаще, чем в других антропологических группах. В целом структура микробиоценоза влагалища обследованных нами женщин схожа с таковой у женщин азиатской группы. Вопрос о том, насколько полученные нами данные могут

быть сравнимы с результатами аналогичных исследований в других регионах России, требует дальнейшего изучения.

ВЫВОДЫ

Состояние микробиоценоза влагалища у женщин репродуктивного возраста, считающих себя здоровыми, характеризуется высокой частотой обнаружения дисбиоза методом ПЦР-РВ: он был выявлен у каждой пятой пациентки. Нормоценоз чаще всего сопровождался преобладанием *L. iners*, а вариант нормоценоза с преобладанием *L. crispatus* определяли только у каждой третьей женщины. При этом вариант нормоценоза с преобладанием *L. crispatus* более характерен для 46,2 % женщин, которые были отнесены к группе клинически здоровых на основании опроса, клинической оценки состояния влагалища и микроскопического исследования. Таким образом, клиническая оценка состояния нижних отделов гениталий без учета данных микроскопии носит субъективный характер и в ряде случаев не позволяет выявить у пациентки дисбиоз влагалища.

Выявленные нами особенности микробиоценоза влагалища женщин г. Екатеринбурга и их отличия от микробиоценоза влагалища женщин европеоидной группы могут быть связаны с антропологическим разнообразием жительниц Уральского региона.

Литература

- Grice EA, Segre JA. The human microbiome: our second genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2012; 13: 151–70. DOI: 10.1146/annurev-genom-090711-163814.
- Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature.* 2012 Jun 13; 486 (7402): 207–14. DOI: 10.1038/nature11234.
- Macklaim JM, Fernandes AD, Di Bella JM, Hammond JA, Reid G, Gloor GB. Comparative meta-RNA-seq of the vaginal microbiota and differential expression by *Lactobacillus iners* in health and dysbiosis. *Microbiome.* 2013 Apr 12; 1 (1): 12. DOI: 10.1186/2049-2618-1-12.
- Macklaim JM, Gloor GB, Anukam KC, Cribby S, Reid G. At the crossroads of vaginal health and disease, the genome sequence of *Lactobacillus iners* AB-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Mar 15; 108 Suppl 1: 4688–95. DOI: 10.1073/pnas.1000086107.
- Ravel J, Brotman RM, Gajer P, Ma B, Nandy M, Fadrosh DW, et al. Daily temporal dynamics of vaginal microbiota before, during and after episodes of bacterial vaginosis. *Microbiome.* 2013 Dec 2; 1 (1): 29. DOI: 10.1186/2049-2618-1-29.
- Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Mar 15; 108 Suppl 1: 4680–7. DOI: 10.1073/pnas.1002611107.
- Donnarumma G, Molinaro A, Cimino D, De Castro C, Valli V, De Gregorio V, et al. *Lactobacillus crispatus* L1: high cell density cultivation and exopolysaccharide structure characterization to highlight potentially beneficial effects against vaginal pathogens. *BMC Microbiol.* 2014 May 30; 14: 137. DOI: 10.1186/1471-2180-14-137.
- McLean NW, Rosenstein IJ. Characterisation and selection of a *Lactobacillus* species to re-colonise the vagina of women with recurrent bacterial vaginosis. *J Med Microbiol.* 2000; 49 (6): 543–52. DOI: 10.1099/0022-1317-49-6-543.
- Ворошилина Е. С., Донников А. Е., Плотко Е. Э., Тумбинская Л. В., Хаютин Л. В. Биоценоз влагалища с точки зрения количественной полимеразной цепной реакции: что есть норма? *Акушерство и гинекология.* 2011; (1): 57–65.
- Кира Е. Ф. Бактериальный вагиноз. С-Пб.: Нева-Люкс; 2001. 364 с.

References

1. Grice EA, Segre JA. The human microbiome: our second genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2012; 13: 151–70. DOI: 10.1146/annurev-genom-090711-163814.
2. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature.* 2012 Jun 13; 486 (7402): 207–14. DOI: 10.1038/nature11234.
3. Macklaim JM, Fernandes AD, Di Bella JM, Hammond JA, Reid G, Gloor GB. Comparative meta-RNA-seq of the vaginal microbiota and differential expression by *Lactobacillus iners* in health and dysbiosis. *Microbiome.* 2013 Apr 12; 1 (1): 12. DOI: 10.1186/2049-2618-1-12.
4. Macklaim JM, Gloor GB, Anukam KC, Cribby S, Reid G. At the crossroads of vaginal health and disease, the genome sequence of *Lactobacillus iners* AB-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Mar 15; 108 Suppl 1: 4688–95. DOI: 10.1073/pnas.1000086107.
5. Ravel J, Brotman RM, Gajer P, Ma B, Nandy M, Fadrosh DW, et al. Daily temporal dynamics of vaginal microbiota before, during and after episodes of bacterial vaginosis. *Microbiome.* 2013 Dec 2; 1 (1): 29. DOI: 10.1186/2049-2618-1-29.
6. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Mar 15; 108 Suppl 1: 4680–7. DOI: 10.1073/pnas.1002611107.
7. Donnarumma G, Molinaro A, Cimini D, De Castro C, Valli V, De Gregorio V, et al. *Lactobacillus crispatus* L1: high cell density cultivation and exopolysaccharide structure characterization to highlight potentially beneficial effects against vaginal pathogens. *BMC Microbiol.* 2014 May 30; 14: 137. DOI: 10.1186/1471-2180-14-137.
8. McLean NW, Rosenstein IJ. Characterisation and selection of a *Lactobacillus* species to re-colonise the vagina of women with recurrent bacterial vaginosis. *J Med Microbiol.* 2000; 49 (6): 543–52. DOI: 10.1099/0022-1317-49-6-543.
9. Voroshilina ES, Tumbinskaya LV, Donnikov AE, Plotko EA, Khayutin LV. [Vaginal biocenosis with a view to quantitative polymerase chain reaction: what is its norm?] *Obstetrics and Gynecology.* 2011; (1): 57–65. Russian.
10. Kira EF. *Bakterial'nyj vaginoz.* Sankt-Peterburg: Neva-Lyuks; 2001. 364 p. Russian.

ПРЕОБЛАДАНИЕ *LACTOBACILLUS INERS* В МИКРОБИОЦЕНОЗЕ ВЛАГАЛИЩА ЖЕНЩИН С УМЕРЕННЫМ ДИСБИОЗОМ АССОЦИИРОВАНО С НАЛИЧИЕМ КЛИНИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ ВЛАГАЛИЩА

Е. С. Ворошилина^{1,2} ✉, Е. Э. Плотко^{2,3}, Л. В. Хаютин², Н. А. Тищенко¹, Д. Л. Зорников¹

¹ Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии, медико-профилактический факультет, Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург

² Медико-фармацевтический центр «Гармония», Екатеринбург

³ Кафедра акушерства и гинекологии, лечебно-профилактический факультет, Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург

Умеренный дисбиоз влагалища является переходным типом вагинального микробиоценоза, для которого характерно увеличение количества и доли условно-патогенных микроорганизмов при сохранении высокой доли лактофлоры — на уровне 20–80 % от общей микробной биомассы. У части женщин данное состояние микробиоценоза не сопровождается клиническими признаками инфекционно-воспалительной патологии влагалища (ИВП), и возникает вопрос о целесообразности коррекции умеренного дисбиоза в этом случае. В исследовании оценивали взаимосвязь между отдельными микробиологическими показателями и наличием клинических проявлений ИВП у пациенток с умеренным дисбиозом вагинальной микробиоты. Были сформированы две группы участниц: группа 1 — пациентки с клиническими признаками ИВП ($n = 91$), группа 2 — клинически здоровые женщины ($n = 44$). Средний возраст женщин составил $26,9 \pm 6,9$ лет. Микробиоценоз исследовали методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени». Провели количественную оценку 6 видов лактобацилл в вагинальном отделяемом: *Lactobacillus crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. vaginalis*. Было установлено, что *L. iners* преобладает в микробиоценозе 45 (49,5 %) пациенток с признаками ИВП, тогда как у клинически здоровых женщин преобладание данного вида лактобацилл зафиксировали в 9 (20,5 %) случаях ($p = 0,002$). *L. gasseri*, наоборот, достоверно чаще преобладал в образцах, полученных от клинически здоровых пациенток: 23 (52,3 %) случая против 21 (23,1 %) в группе пациенток с клиническими признаками ИВП ($p = 0,001$).

Ключевые слова: микробиоценоз влагалища, вагинальные лактобациллы, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus gasseri*, умеренный дисбиоз влагалища

Благодарности: авторы благодарят Валерия Хаютина, директора Медико-фармацевтического центра «Гармония», за возможность выполнения исследования на базе центра.

✉ **Для корреспонденции:** Ворошилина Екатерина Сергеевна
ул. Фурманова, д. 30, г. Екатеринбург, 620142; voroshilina@gmail.com

Статья получена: 09.04.2017 **Статья принята к печати:** 20.04.2017

PREVALENCE OF *LACTOBACILLUS INERS* IN THE VAGINAL MICROBIOTA OF WOMEN WITH MODERATE DYSBIOSIS IS ASSOCIATED WITH CLINICAL SYMPTOMS OF INFECTIOUS INFLAMMATORY CONDITION OF THE VAGINA

Voroshilina ES^{1,2} ✉, Plotko EE^{2,3}, Khayutin LV², Tischenko NA¹, Zornikov DL¹

¹ Department of Microbiology, Virology and Immunology, Faculty of Preventive Medicine, Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russia

² Harmony Medical and Pharmaceutical Center, Yekaterinburg, Russia

³ Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine and Healthcare, Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russia

Moderate vaginal dysbiosis is a shift in normal vaginal microbiota composition characterized by increased levels of opportunistic microbes and an ordinary high proportion of lactobacilli that make up 20 to 80 % of the total microbial population of the vagina. Some women with vaginal dysbiosis do not show any symptoms of the infectious inflammatory condition (IIC), which raises the question of whether their dysbiosis should be corrected. We studied the association between some parameters of the microbiota and clinical symptoms of IIC in female patients with moderate vaginal dysbiosis. Participants were distributed into two groups: group 1 included patients with clinical symptoms of IIC ($n = 91$), group 2 was comprised of asymptomatic patients ($n = 44$). Mean age was 26.9 ± 6.9 years. Vaginal microbial communities were studied using real-time polymerase chain reaction assays. Levels of six *Lactobacillus* species were measured in the vaginal discharge: *Lactobacillus crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, and *L. vaginalis*. We found that *L. iners* dominated the microbiota of 45 (49.5 %) symptomatic patients and only 9 (20.5 %) asymptomatic individuals ($p = 0.002$), unlike *L. gasseri* that significantly prevailed in the samples of asymptomatic patients: 23 (52.3 %) women vs 21 (23.1 %) in the group of patients with clinical signs of IIC ($p = 0.001$).

Keywords: vaginal microbiota, vaginal lactobacilli, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus gasseri*, moderate vaginal dysbiosis

Acknowledgements: the authors wish to thank Director of *Harmony* Medical and Pharmaceutical Center, Yekaterinburg, for the opportunity to conduct the study at the facilities of the Center.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ekaterina Voroshilina
ul. Furmanova, d. 30, Yekaterinburg, Russia, 620142; voroshilina@gmail.com

Received: 09.04.2017 **Accepted:** 20.04.2017

Многочисленные исследования показывают, что влагалище здоровых женщин колонизируют преимущественно представители рода *Lactobacillus* [1–4]. Принято считать, что вагинальная лактофлора способствует поддержанию колонизационной резистентности биотопа. Кроме лактобацилл эпителий влагалища могут населять другие группы микроорганизмов, однако у здоровых женщин они присутствуют в меньших количествах.

Многие населяющие влагалище микроорганизмы требовательны к условиям культивирования или вовсе не способны к росту на питательных средах [5–8], в том числе отдельные виды лактобацилл не культивируются на традиционных питательных средах. Так, было продемонстрировано, что один из наиболее распространенных видов — *Lactobacillus iners* — не способен к росту на MRS-агаре и агаре Рогоза, применяемых для выделения лактобацилл [9]. Поэтому культуральное исследование дает ограниченное представление о видовом составе вагинального микробиоценоза. На сегодняшний день наиболее информативным подходом для комплексной оценки вагинальной микробиоты является применение молекулярно-генетических методик исследования.

Критерием нормоценоза при исследовании микробиоценоза влагалища методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ) является содержание лактобацилл в количестве не менее 80 % от всех выявляемых микроорганизмов [10]. Состояние микробиоценоза влагалища, при котором доля лактофлоры находится в диапазоне 20–80 % от суммы всех выявленных микроорганизмов, расценивают как умеренный дисбиоз. Этот микробиоценоз представляет интерес для исследователей и врачей: у части пациенток умеренный дисбиоз не сопровождается клиническими проявлениями, поэтому остается открытым вопрос о целесообразности коррекции умеренного дисбиоза при отсутствии у пациенток клинических признаков инфекционно-воспалительной патологии влагалища.

Актуальным представляется поиск микробиологических маркеров, ассоциированных с наличием клинических признаков инфекционно-воспалительной патологии влагалища у пациенток с умеренным дисбиозом. Исследование видового состава лактофлоры у женщин репродуктивного возраста показало, что частота преобладания отдельных видов лактобацилл различается среди пациенток с различными вариантами микробиоценоза [11]. Возможно, существует связь между составом лактофлоры при умеренном дисбиозе и наличием у пациенток объективных и субъективных признаков инфекционно-воспалительной патологии влагалища. Не исключено также, что развитие клинических признаков патологии при умеренном дисбиозе определяется особенностями состава условно-патогенной микрофлоры, представленной разными группами микроорганизмов.

Цель исследования — оценить взаимосвязь между отдельными микробиологическими показателями и наличием клинических проявлений инфекционной патологии влагалища у пациенток с умеренным дисбиозом вагинальной микробиоты.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследование включили 135 женщин с умеренным дисбиозом влагалища в возрасте от 18–53 лет (средний возраст — 26,9 ± 6,9 лет), наблюдавшихся в медицинском

центре «Гармония» (г. Екатеринбург) в 2011–2016 гг. Критериями включения являлось отсутствие у пациенток ВИЧ-инфекции, парентеральных гепатитов, возбудителей инфекций, передающихся половым путем: *Treponema pallidum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* и *Trichomonas vaginalis*, — а также отсутствие системного или местного приема антимикробных препаратов в течение 4 недель перед исследованием.

Материал для исследования (соскоб заднебоковой стенки влагалища) собирали в пробирку типа Eppendorf, содержащую 1 мл физиологического раствора. ДНК выделяли с помощью набора реагентов «ПРОБА ГС» («НПО ДНК-технология», Россия). Качественный и количественный состав микробиоты влагалища оценивали методом ПЦР-РВ с помощью тест-системы «Фемофлор» («НПО ДНК-технология»). Определение наличия и количества 6 видов вагинальных лактобацилл (*Lactobacillus crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. vaginalis*) проводили методом ПЦР-РВ с использованием тест-систем для научного применения («НПО ДНК-технология»). Постановку ПЦР-РВ осуществляли в детектирующих амплификаторах «ДТ-96» («НПО ДНК-технология»).

Признаки инфекционно-воспалительного заболевания оценивали по наличию жалоб пациенток и объективных клинических проявлений, характерных для инфекционно-воспалительной патологии нижних отделов гениталий.

Для обработки и анализа данных использовали программу Microsoft Office Excel 2007. Для оценки достоверности различий рассчитывали двусторонний критерий Фишера в программе WinPeri.

Исследование было одобрено этическим комитетом при Уральском ГМУ (протокол № 4 от 05.05.2015). Все пациентки дали письменное информированное согласие на участие в исследовании.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все пациентки были разделены на две группы в зависимости от наличия клинических признаков инфекционно-воспалительной патологии нижних отделов гениталий (ИВП). Группу 1 составили 91 человек с клиническими признаками ИВП, группу 2 — 44 клинически здоровых женщины. Была предпринята попытка установить связь между долей лактобацилл в микробиоценозе, преобладающим видом лактобацилл, преобладающим видом условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) и наличием ИВП.

По доле лактофлоры в микробиоценозе всех пациенток разбили на три подгруппы: с долей лактофлоры в 20–40 %, 40–60 % и 60–80 %. Далее оценивали удельный вес каждой подгруппы в группах 1 и 2 (рис. 1). Выявленные различия между группами были статистически недостоверными.

Частота выявления отдельных видов лактобацилл в качестве преобладающих была разной в группах 1 и 2 (рис. 2). *L. iners* достоверно чаще определяли как преобладающий вид в группе 1 (пациентки с ИВП) по сравнению с группой 2: 45 (49,5 %) случаев против 9 (20,5 %) соответственно ($p = 0,002$). *L. gasseri*, наоборот, достоверно чаще преобладал в группе 2 (клинически здоровые женщины) по сравнению с группой 1: 23 (52,3 %) случая против 21 (23,1 %) соответственно ($p = 0,001$). Виды *L. crispatus*, *L. jensenii* и *L. vaginalis* преобладали в обеих группах с сопоставимой частотой.



Рис. 1. Доля лактофлоры в микробиоценозе влагалища женщин с умеренным дисбиозом при наличии и отсутствии клинических признаков инфекционно-воспалительной патологии влагалища (n = 135)

Среди условно-патогенной микрофлоры влагалища у каждой второй женщины независимо от наличия признаков ИВП преобладали бактерии группы *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas spp.* (группа GPP). Остальные группы УПМ преобладали значительно реже, достоверных различий между частотой преобладания различных групп УПМ у пациенток в группах 1 и 2 выявлено не было (таблица).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты исследования показывают, что во влагалище женщин репродуктивного возраста лактофлора представлена преимущественно такими видами, как *L. crispatus*, *L. iners*, *L. gasseri*, *L. jensenii*, что согласуется с результатами других исследований [1, 2, 12, 13]. Примечательно, что у пациенток с умеренным дисбиозом среди лактофлоры чаще преобладают виды *L. iners* и *L. gasseri*. Зарубежными исследователями уже было продемонстрировано, что обнаружение этих видов лактобацилл коррелирует с повышенным риском развития бактериального вагиноза и неблагоприятным исходом беременности [14–16]. Ранее нами было показано, что *L. gasseri* может преобладать именно при умеренном дисбиозе [11]. Частое выявление *L. gasseri* в качестве преобладающего вида среди пациенток без признаков ИВП, состояние микробиоценоза которых соответствует критериям умеренного дисбиоза, позволяет предположить, что данный тип микробиоценоза

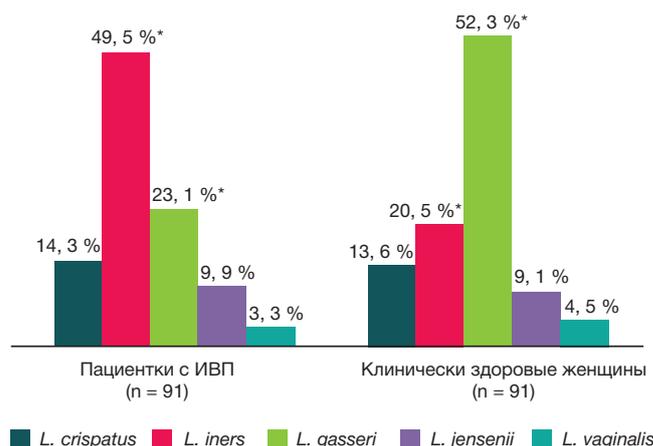


Рис. 2. Частота преобладания отдельных видов лактобацилл в микробиоценозе женщин с умеренным дисбиозом при наличии и отсутствии клинических признаков инфекционно-воспалительной патологии влагалища (n = 135). Звездочками отмечены достоверно различающиеся показатели при $p < 0,01$

может являться вариантом нормы и не требует коррекции. В то же время умеренный дисбиоз с представленной преимущественно *L. iners* лактофлорой часто сопровождается клиническими признаками ИВП. Более того, преобладание *L. iners* ассоциировано с повышенным риском развития выраженных дисбиотических нарушений во влагалище [11]. В недавних исследованиях было установлено, что данный вид лактобацилл быстро адаптируется к меняющимся условиям в биотопе и может выживать в присутствии повышенных количеств УПМ [17, 18]. Поэтому выявление у пациенток с умеренным дисбиозом лактофлоры, представленной исключительно *L. iners*, является крайне неблагоприятным признаком, а такие варианты микробиоценоза однозначно требуют коррекции.

В ходе настоящего исследования не было выявлено зависимости между долей лактофлоры в микробиоценозе и наличием признаков ИВП у пациенток с умеренным дисбиозом влагалища. Однако не исключено, что полученный результат обусловлен малым количеством пациенток в исследуемых группах, тогда как в других исследованиях данная зависимость может быть установлена.

Среди условно-патогенной микрофлоры независимо от наличия ИВП у женщин с умеренным дисбиозом преобладали чаще других микроорганизмы группы GPP. Более чем в половине случаев условно-патогенная микрофлора у обследуемых пациенток была преимущественно представлена бактериями данной группы. В исследованиях *in vitro*

Частота преобладания отдельных групп условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) среди условно-патогенной микрофлоры женщин с умеренным дисбиозом влагалища при наличии и отсутствии клинических признаков инфекционно-воспалительной патологии (ИВП) влагалища (n = 135)

Преобладающая группа УПМ	Пациентки с ИВП (n = 91)	Клинически здоровые женщины (n = 44)
Семейство <i>Enterobacteriaceae</i>	3 (3,3 %)	0
<i>Streptococcus spp.</i>	6 (6,6 %)	6 (13,6 %)
<i>Enterococcus spp.</i>	0	2 (4,5 %)
<i>Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas spp.</i>	50 (54,9 %)	24 (54,5 %)
<i>Eubacterium spp.</i>	8 (8,8 %)	5 (11,4 %)
<i>Sneathia spp./Leptotrichia spp./Fusobacterium spp.</i>	2 (2,2 %)	0
<i>Megasphaera spp./Veilonella spp./Dialister spp.</i>	4 (4,4 %)	3 (6,8 %)
<i>Clostridium spp./Lachnobacterium spp.</i>	3 (3,3 %)	0
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	0	1 (2,3 %)
<i>Atopobium vaginae</i>	15 (16,5 %)	3 (6,8 %)

было продемонстрировано, что *Gardnerella vaginalis*, вид, входящий в состав группы GPP, обладает крайне высоким адгезивным потенциалом [19, 20] и стимулирует рост других УГПМ, в том числе и *Prevotella bivia*, также входящей в состав группы GPP [19]. Было выдвинуто предположение, что именно *G.vaginalis* может являться первичным микроорганизмом, колонизирующим биологическую поверхность и обеспечивающим условия для колонизации другими микроорганизмами [21, 22]. Данные факты и гипотезы объясняют столь частое выявление группы GPP как доминантной среди условно-патогенной микрофлоры у пациенток с умеренным дисбиозом. Возможно, что при усугублении дисбиотических нарушений будет увеличиваться вклад других УГПМ, например, *Atopobium vaginae* — микроорганизма, также высокоассоциированного с дисбиозом влагалища [23–26]. В настоящем исследовании *A. vaginae* в 2 раза чаще преобладал среди услов-

но-патогенной микрофлоры пациенток с признаками ИВП, чем среди клинически здоровых женщин. Однако различия не были статистически достоверными. Можно предположить, что отсутствие достоверности было обусловлено малым объемом группы клинически здоровых пациенток.

ВЫВОДЫ

Преобладание *Lactobacillus iners* в составе лактофлоры влагалища женщин с умеренным дисбиозом ассоциировано с наличием клинических признаков инфекционно-воспалительной патологии нижних отделов гениталий, тогда как преобладание *L. gasseri* характерно для женщин с умеренным дисбиозом, но клинически здоровых. Таким образом, названные микроорганизмы могут быть микробиологическими маркерами в случаях, когда нет однозначных признаков необходимости коррекции микробиоценоза.

Литература

- Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Mar 15; 108 Suppl 1: 4680–7. DOI: 10.1073/pnas.1002611107.
- Zhou X, Bent SJ, Schneider MG, Davis CC, Islam MR, Forney LJ. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. Microbiology. 2004 Aug; 150 (Pt 8): 2565–73. DOI: 10.1099/mic.0.26905-0.
- Zhou X, Brown CJ, Abdo Z, Davis CC, Hansmann MA, Joyce P, et al. Differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy Caucasian and black women. ISME J. 2007 Jun; 1 (2): 121–3. DOI: 10.1038/ismej.2007.12.
- Zhou X, Hansmann MA, Davis CC, Suzuki H, Brown CJ, Schütte U, et al. The vaginal bacterial communities of Japanese women resemble those of women in other racial groups. FEMS Immunol Med Microbiol. 2010 Mar; 58 (2): 169–81. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2009.00618.x.
- Fredricks DN, Fiedler TL, Marrazzo JM. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. N Engl J Med. 2005 Nov 3; 353 (18): 1899–911. DOI: 10.1056/NEJMoa043802.
- Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. Microbiol Mol Biol Rev. 2004 Dec; 68 (4): 669–85. DOI: 10.1128/MMBR.68.4.669-685.2004.
- Oakley BB, Fiedler TL, Marrazzo JM, Fredricks DN. Diversity of human vaginal bacterial communities and associations with clinically defined bacterial vaginosis. Appl Environ Microbiol. 2008 Aug; 74 (15): 4898–909. DOI: 10.1128/AEM.02884-07.
- Zozaya-Hinchliffe M, Martin DH, Ferris MJ. Prevalence and abundance of uncultivated Megasphaera-like bacteria in the human vaginal environment. Appl Environ Microbiol. 2008 Mar; 74 (5): 1656–9. DOI: 10.1128/AEM.02127-07.
- Falsen E, Pascual C, Sjoden B, Ohlen M, Collins MD. Phenotypic and phylogenetic characterization of a novel Lactobacillus species from human sources: description of Lactobacillus iners sp. nov. Int J Syst Bacteriol. 1999 Jan; 49 Pt 1: 217–21. DOI: 10.1099/00207713-49-1-217.
- Ворошилина Е. С., Донников А. Е., Плотко Е. Э., Тумбинская Л. В., Хаютин Л. В. Биоценоз влагалища с точки зрения количественной полимеразной цепной реакции: что есть норма? Акушерство и гинекология. 2011; (1): 57–65.
- Зорников Д. Л., Тумбинская Л. В., Ворошилина Е. С. Взаимосвязь отдельных видов лактобацилл с суммарной долей лактофлоры в вагинальном микробиоценозе и группами условно-патогенных микроорганизмов, ассоциированными с дисбиозом влагалища. Вестник уральской медицинской академической науки. 2015; 4 (55): 99–105.
- Biagi E, Vitali B, Pugliese C, Candela M, Donders GG, Brighi P. Quantitative variations in the vaginal bacterial population associated with asymptomatic infections: a real-time polymerase chain reaction study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009 Mar; 28 (3): 281–5. DOI: 10.1007/s10096-008-0617-0.
- Shi Y, Chen L, Tong J, Xu C. Preliminary characterization of vaginal microbiota in healthy Chinese women using cultivation-independent methods. J Obstet Gynaecol Res. 2009 Jun; 35 (3): 525–32. DOI: 10.1111/j.1447-0756.2008.00971.x.
- Antonio MA, Hawes SE, Hillier SL. The identification of vaginal Lactobacillus species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. J Infect Dis. 1999 Dec; 180 (6): 1950–6. DOI: 10.1086/315109.
- Petricevic L, Domig KJ, Nierscher FJ, Sandhofer MJ, Fidesser M, Krondorfer I, et al. Characterisation of the vaginal Lactobacillus microbiota associated with preterm delivery. Sci Rep. 2014 May 30; 4: 5136. DOI: 10.1038/srep05136.
- Verstraelen H, Verhelst R, Claeys G, De Backer E, Temmerman M, Vanechoutte M. Longitudinal analysis of the vaginal microflora in pregnancy suggests that L. crispatus promotes the stability of the normal vaginal microflora and that L. gasseri and/or L. iners are more conducive to the occurrence of abnormal vaginal microflora. BMC Microbiol. 2009 Jun 2; 9: 116. DOI: 10.1186/1471-2180-9-116.
- Macklaim JM, Fernandes AD, Di Bella JM, Hammond JA, Reid G, Gloor GB. Comparative meta-RNA-seq of the vaginal microbiota and differential expression by Lactobacillus iners in health and dysbiosis. Microbiome. 2013 Apr 12; 1 (1): 12. DOI: 10.1186/2049-2618-1-12.
- Macklaim JM, Gloor GB, Anukam KC, Cribby S, Reid G. At the crossroads of vaginal health and disease, the genome sequence of Lactobacillus iners AB-1. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Mar 15; 108 Suppl 1: 4688–95. DOI: 10.1073/pnas.1000086107.
- Machado A, Jefferson KK, Cerca N. Interactions between Lactobacillus crispatus and Bacterial Vaginosis (BV)-Associated Bacterial Species in Initial Attachment and Biofilm Formation. Int J Mol Sci. 2013 Jun 5; 14 (6): 12004–12. DOI: 10.3390/ijms140612004.
- Patterson JL, Stull-Lane A, Girerd PH, Jefferson KK. Analysis of adherence, biofilm formation and cytotoxicity suggests a greater virulence potential of Gardnerella vaginalis relative to other bacterial-vaginosis-associated anaerobes. Microbiology. 2010 Feb; 156 (Pt 2): 392–9. DOI: 10.1099/mic.0.034280-0.
- Swidsinski A, Dörffel Y, Loening-Baucke V, Schilling J, Mendling W. Response of Gardnerella vaginalis biofilm to 5 days of moxifloxacin treatment. FEMS Immunol Med Microbiol. 2011 Feb; 61 (1): 41–6. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2010.00743.x.
- Swidsinski A, Mendling W, Loening-Baucke V, Ladhoff A, Swidsinski S, Hale LP, et al. Adherent biofilms in bacterial vaginosis. Obstet Gynecol. 2005 Nov; 106 (5 Pt 1): 1013–23.

- DOI: 10.1097/01.AOG.0000183594.45524.d2.
23. Bradshaw CS, Tabrizi SN, Fairley CK, Morton AN, Rudland E, Garland SM. The association of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* with bacterial vaginosis and recurrence after oral metronidazole therapy. *J Infect Dis.* 2006 Sep 15; 194 (6): 828–36. DOI: 10.1086/506621.
 24. Ferris MJ, Maszta A, Aldridge KE, Fortenberry JD, Fidel PL Jr, Martin DH. Association of *Atopobium vaginae*, a recently described metronidazole resistant anaerobe, with bacterial vaginosis. *BMC Infect Dis.* 2004 Feb 13; 4: 5. DOI: 10.1186/1471-2334-4-5.
 25. Menard JP, Fenollar F, Henry M, Bretelle F, Raoult D. Molecular quantification of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* loads to predict bacterial vaginosis. *Clin Infect Dis.* 2008 Jul 1; 47 (1): 33–43. DOI: 10.1086/588661.
 26. Trama JP, Pascal KE, Zimmerman J, Self MJ, Mordechai E, Adelson ME. Rapid detection of *Atopobium vaginae* and association with organisms implicated in bacterial vaginosis. *Mol Cell Probes.* 2008 Apr; 22 (2): 96–102. DOI: 10.1016/j.mcp.2007.08.002.

References

1. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Mar 15; 108 Suppl 1: 4680–7. DOI: 10.1073/pnas.1002611107.
2. Zhou X, Bent SJ, Schneider MG, Davis CC, Islam MR, Forney LJ. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiology.* 2004 Aug; 150 (Pt 8): 2565–73. DOI: 10.1099/mic.0.26905-0.
3. Zhou X, Brown CJ, Abdo Z, Davis CC, Hansmann MA, Joyce P, et al. Differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy Caucasian and black women. *ISME J.* 2007 Jun; 1 (2): 121–3. DOI: 10.1038/ismej.2007.12.
4. Zhou X, Hansmann MA, Davis CC, Suzuki H, Brown CJ, Schütte U, et al. The vaginal bacterial communities of Japanese women resemble those of women in other racial groups. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010 Mar; 58 (2): 169–81. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2009.00618.x.
5. Fredricks DN, Fiedler TL, Marrazzo JM. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *N Engl J Med.* 2005 Nov 3; 353 (18): 1899–911. DOI: 10.1056/NEJMoa043802.
6. Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004 Dec; 68 (4): 669–85. DOI: 10.1128/MMBR.68.4.669-685.2004.
7. Oakley BB, Fiedler TL, Marrazzo JM, Fredricks DN. Diversity of human vaginal bacterial communities and associations with clinically defined bacterial vaginosis. *Appl Environ Microbiol.* 2008 Aug; 74 (15): 4898–909. DOI: 10.1128/AEM.02884-07.
8. Zozaya-Hinchliffe M, Martin DH, Ferris MJ. Prevalence and abundance of uncultivated *Megasphaera*-like bacteria in the human vaginal environment. *Appl Environ Microbiol.* 2008 Mar; 74 (5): 1656–9. DOI: 10.1128/AEM.02127-07.
9. Falsen E, Pascual C, Sjoden B, Ohlen M, Collins MD. Phenotypic and phylogenetic characterization of a novel *Lactobacillus* species from human sources: description of *Lactobacillus iners* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1999 Jan; 49 Pt 1: 217–21. DOI: 10.1099/00207713-49-1-217.
10. Voroshilina ES, Tumbinskaya LV, Donnikov AE, Plotko EA, Khayutin LV. [Vaginal biocenosis with a view to quantitative polymerase chain reaction: what is its norm?] *Obstetrics and Gynecology.* 2011; (1): 57–65. Russian.
11. Zornikov DL, Tumbinskaya LV, Voroshilina ES. [Relationship vaginal lactobacilli species with common proportion of *Lactobacillus* spp. in vaginal microbiocenosis and amounts of microorganisms, associated with dysbiosis]. *Journal of Ural Medical Academic Science.* 2015; 4 (55): 99–105. Russian.
12. Biagi E, Vitali B, Pugliese C, Candela M, Donders GG, Brigidi P. Quantitative variations in the vaginal bacterial population associated with asymptomatic infections: a real-time polymerase chain reaction study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009 Mar; 28 (3): 281–5. DOI: 10.1007/s10096-008-0617-0.
13. Shi Y, Chen L, Tong J, Xu C. Preliminary characterization of vaginal microbiota in healthy Chinese women using cultivation-independent methods. *J Obstet Gynaecol Res.* 2009 Jun; 35 (3): 525–32. DOI: 10.1111/j.1447-0756.2008.00971.x.
14. Antonio MA, Hawes SE, Hillier SL. The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *J Infect Dis.* 1999 Dec; 180 (6): 1950–6. DOI: 10.1086/315109.
15. Petricevic L, Domig KJ, Nierscher FJ, Sandhofer MJ, Fidesser M, Krondorfer I, et al. Characterisation of the vaginal *Lactobacillus* microbiota associated with preterm delivery. *Sci Rep.* 2014 May 30; 4: 5136. DOI: 10.1038/srep05136.
16. Verstraelen H, Verhelst R, Claeys G, De Backer E, Temmerman M, Vaneechoutte M. Longitudinal analysis of the vaginal microflora in pregnancy suggests that *L. crispatus* promotes the stability of the normal vaginal microflora and that *L. gasseri* and/or *L. iners* are more conducive to the occurrence of abnormal vaginal microflora. *BMC Microbiol.* 2009 Jun 2; 9: 116. DOI: 10.1186/1471-2180-9-116.
17. Macklaim JM, Fernandes AD, Di Bella JM, Hammond JA, Reid G, Gloor GB. Comparative meta-RNA-seq of the vaginal microbiota and differential expression by *Lactobacillus iners* in health and dysbiosis. *Microbiome.* 2013 Apr 12; 1 (1): 12. DOI: 10.1186/2049-2618-1-12.
18. Macklaim JM, Gloor GB, Anukam KC, Cribby S, Reid G. At the crossroads of vaginal health and disease, the genome sequence of *Lactobacillus iners* AB-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Mar 15; 108 Suppl 1: 4688–95. DOI: 10.1073/pnas.1000086107.
19. Machado A, Jefferson KK, Cerca N. Interactions between *Lactobacillus crispatus* and Bacterial Vaginosis (BV)-Associated Bacterial Species in Initial Attachment and Biofilm Formation. *Int J Mol Sci.* 2013 Jun 5; 14 (6): 12004–12. DOI: 10.3390/ijms1406120004.
20. Patterson JL, Stull-Lane A, Girerd PH, Jefferson KK. Analysis of adherence, biofilm formation and cytotoxicity suggests a greater virulence potential of *Gardnerella vaginalis* relative to other bacterial-vaginosis-associated anaerobes. *Microbiology.* 2010 Feb; 156 (Pt 2): 392–9. DOI: 10.1099/mic.0.034280-0.
21. Swidsinski A, Dörffel Y, Loening-Baucke V, Schilling J, Mendling W. Response of *Gardnerella vaginalis* biofilm to 5 days of moxifloxacin treatment. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2011 Feb; 61 (1): 41–6. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2010.00743.x.
22. Swidsinski A, Mendling W, Loening-Baucke V, Ladhoff A, Swidsinski S, Hale LP, et al. Adherent biofilms in bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol.* 2005 Nov; 106 (5 Pt 1): 1013–23. DOI: 10.1097/01.AOG.0000183594.45524.d2.
23. Bradshaw CS, Tabrizi SN, Fairley CK, Morton AN, Rudland E, Garland SM. The association of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* with bacterial vaginosis and recurrence after oral metronidazole therapy. *J Infect Dis.* 2006 Sep 15; 194 (6): 828–36. DOI: 10.1086/506621.
24. Ferris MJ, Maszta A, Aldridge KE, Fortenberry JD, Fidel PL Jr, Martin DH. Association of *Atopobium vaginae*, a recently described metronidazole resistant anaerobe, with bacterial vaginosis. *BMC Infect Dis.* 2004 Feb 13; 4: 5. DOI: 10.1186/1471-2334-4-5.
25. Menard JP, Fenollar F, Henry M, Bretelle F, Raoult D. Molecular quantification of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* loads to predict bacterial vaginosis. *Clin Infect Dis.* 2008 Jul 1; 47 (1): 33–43. DOI: 10.1086/588661.
26. Trama JP, Pascal KE, Zimmerman J, Self MJ, Mordechai E, Adelson ME. Rapid detection of *Atopobium vaginae* and association with organisms implicated in bacterial vaginosis. *Mol Cell Probes.* 2008 Apr; 22 (2): 96–102. DOI: 10.1016/j.mcp.2007.08.002.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ И БЕЗОПАСНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ОТЕЧЕСТВЕННОГО ЦЕПЭГИНТЕРФЕРОНА АЛЬФА-2В В ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА С. ОПЫТ РЕАЛЬНОЙ КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКИ

С. В. Ткачева¹✉, Э. Р. Манапова¹, Ю. М. Созинова^{1,2}, Ф. М. Якупова^{1,2}, Ю. В. Фазылова³

¹Кафедра инфекционных болезней, медико-профилактический факультет, Казанский государственный медицинский университет, Казань

²Консультативно-диагностическое отделение, Республиканская клиническая инфекционная больница имени А. Ф. Агафонова, Казань

³Кафедра терапевтической стоматологии, стоматологический факультет, Казанский государственный медицинский университет, Казань

В настоящее время для лечения хронического гепатита С (ХГС) используют как безинтерфероновые, так и интерферонсодержащие схемы противовирусной терапии. Последние достаточно широко используются в России за счет доступности препаратов интерферона широким слоям населения. С 2013 г. в клинической практике используется оригинальный российский препарат — цепэгинтерферон альфа-2b (цепэгиФН альфа-2b; торговая марка «Альгерон», «Биокад», Россия). Целью настоящего исследования являлась оценка эффективности и безопасности цепэгиФН альфа-2b при его применении с рибавирином для лечения пациентов с ХГС. Исследование было проведено в 2014–2016 гг., в нем приняли участие 37 пациентов с ХГС (генотип вируса 1): 22 мужчины и 15 женщин (средний возраст — 42,0 ± 5,2 года). Все они впервые получали комбинированную противовирусную терапию (ПВТ): цепэгиФН альфа-2b в дозе 1,5 мкг/кг/нед. и рибавирин в дозе 15 мг/кг/сут. в течение 48 недель. Эффективность ПВТ оценивали по частоте достижения устойчивого вирусологического ответа (УВО) — авиремии через 24 недели после ПВТ. В нашем исследовании УВО достигли 26 пациентов (70,3 %). Зарегистрированные на фоне ПВТ нежелательные явления были характерными для интерферона и рибавирина. Дозу цепэгиФН альфа-2b в связи с развитием нейтропении корректировали 2 пациентам, дозу рибавирина в связи с развитием анемии — 3 пациентам. Полученные результаты позволяют рекомендовать цепэгиФН альфа-2b для включения в схемы комбинированной противовирусной терапии для лечения больных с ХГС.

Ключевые слова: хронический гепатит С, вирус гепатита С, противовирусная терапия, цепэгинтерферон альфа-2b, рибавирин, вирусологический ответ, эффективность лечения

✉ Для корреспонденции: Ткачева Светлана Васильевна
ул. Бултерова, д. 49, г. Казань, 420012; tkacheva-kgmu@mail.ru

Статья получена: 09.02.2017 Статья принята к печати: 10.03.2017

EFFECTIVENESS AND SAFETY OF TREATMENT WITH DOMESTIC CEPEGINTERFERON ALPHA-2B IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C INFECTION. ACTUAL CLINICAL EXPERIENCE

Tkacheva SV¹✉, Manapova ER¹, Sozinova YuM^{1,2}, Yakupova FM^{1,2}, Fazylova YuV³

¹ Department of Infectious Diseases, Faculty of Medical and Preventive Care, Kazan State Medical University, Kazan, Russia

² Diagnostic and Consultation Unit, Agafovon Republican Clinical Hospital of Infectious Diseases, Kazan, Russia

³ Department of Dental Therapy, Faculty of Dentistry, Kazan State Medical University, Kazan, Russia

Interferon-based regimens for chronic hepatitis C (HCV) are quite common, just like interferon-free treatments, and are extensively used in Russia because interferon is widely available to most patients. In 2013 the original Russian drug cepeginterferon alpha-2b (cepegIFN alpha-2b marketed as Algeron by Biocad, Russia) was introduced into clinical practice. The aim of this study was to assess effectiveness and safety of cepegIFN alpha-2b as part of the combination therapy with ribavirin in patients with chronic HCV infection. The study was conducted over the period from 2014 to 2016 and recruited 37 patients with chronic genotype 1 HCV infection: 22 men and 15 women (mean age of 42.0 ± 5.2 years). All of them received the following combination antiviral therapy (AT): 1.5 µg/kg cepegIFN alpha-2b once a week and 15 µg/kg ribavirin daily over the period of 48 weeks. Effectiveness of AT was assessed by the rate of sustained virological response (SVR), i. e. aviremia achieved 24 weeks after the onset of treatment. In our SVR was observed in 26 patients (70.3 %). Adverse effects seen in the course of AT were typical of interferon-based drugs and ribavirin. CepegIFN alpha-2b dosage was corrected in two patients who developed neutropenia; ribavirin dosage was corrected in 3 patients who developed anemia. Based on the obtained results, we recommend including cepegIFN alpha-2b into the combination antiviral therapy in patients with chronic HCV infection.

Keywords: chronic hepatitis C, HCV infection, antiviral therapy, cepeginterferon alpha-2b, ribavirin, virological response, treatment effectiveness

✉ Correspondence should be addressed: Svetlana Tkacheva
ul. Butlerova, d. 49, Kazan, Russia, 420012; tkacheva-kgmu@mail.ru

Received: 09.02.2017 Accepted: 10.03.2017

В настоящее время 2–3 % населения планеты инфицировано вирусом гепатита С [1, 2]. Известно, что HCV-инфекция (hepatitis C virus, HCV) характеризуется длительным бессимптомным течением. При отсутствии лечения у части пациентов прогрессирует фиброз печени, развивается цирроз печени, печеночная недостаточность и гепатоцеллюлярная карцинома [1–3].

Основной мерой борьбы с хроническим гепатитом С (ХГС) является специфическая противовирусная терапия (ПВТ). В соответствии с европейскими и национальными рекомендациями в качестве кандидатов для проведения ПВТ следует рассматривать всех HCV-инфицированных, при этом определены категории пациентов, которым необходимо срочное начало ПВТ, и пациентов, лечение которых может быть отложено [1, 2].

В арсенале практического врача имеются как интерферонсодержащие, так и безинтерфероновые схемы лечения ХГС. Терапией первой линии является использование пегилированного интерферона альфа (пэг-ИФН) в сочетании с рибавирином [1–3]. Пэг-ИФН образуются путем присоединения к молекуле интерферона полимерной структуры — полиэтиленгликоля. Терапевтический эффект пэг-ИФН обусловлен исключительно интерфероном, которому свойственно противовирусное, иммуномодулирующее и антипролиферативное действие. Конъюгация с полиэтиленгликолем увеличивает молекулярную массу итоговой молекулы, удлинняя период циркуляции ИФН альфа в крови.

На российском рынке одним из наиболее доступных пег-ИФН является оригинальный отечественный препарат — цепэгинтерферон альфа-2b (торговая марка «Альгерон», «Биокад», Россия) с молекулярной массой полиэтиленгликоля 20 кДа. Он применяется в повседневной клинической практике с 2013 г. [4, 5]. В отличие от других препаратов этой группы (пэг-ИФН альфа-2a и пэг-ИФН альфа-2b) цепэгИФН альфа-2b представлен одним изомером, что определяет гомогенность его состава и стабильную противовирусную активность. В клинических исследованиях была показана достаточная эффективность и приемлемый профиль безопасности цепэгИФН альфа-2b в сравнении с другими пэг-ИФН, что позволило включить его в двойные и тройные схемы терапии ХГС [6, 7]. Крайне важно, что схемы ПВТ, содержащие цепэгИФН альфа-2b, доступны большинству HCV-инфицированных пациентов в России, в том числе с точки зрения стоимости препарата. Это определяет актуальность обсуждения его эффективности, безопасности и переносимости [5, 7].

Целью настоящего исследования являлась оценка эффективности и безопасности применения цепэгИФН альфа-2b с рибавирином у пациентов с ХГС в условиях реальной клинической практики.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование было проведено на базе Республиканской клинической инфекционной больницы имени А. Ф. Агафонова г. Казани (РКИБ) в 2014–2016 гг. В нем приняли участие 37 пациентов с ХГС: 22 мужчины и 15 женщин в возрасте от 23 до 65 лет (средний возраст — $42,0 \pm 5,2$ года). Длительность инфицирования до 5 лет имели 45 % больных. Все участники впервые получали комбинированную ПВТ: цепэгИФН альфа-2b в дозе 1,5 мг/кг/нед. и рибавирин в дозе 15 мг/кг/сут. в течение 48 недель.

В период подготовки к терапии, на 4, 12, 24 и 48-й неделе ПВТ, а также через 24 недели после окончания

терапии проводили комплекс исследований: (1) иммуноферментный анализ (ИФА) с определением спектра антител к HCV и HBsAg (оборудование и реагенты: анализатор Multiskan Ascent, Agilent Technologies, США; тест-система «Бест», «Вектор-Бест», Россия); (2) определение вирусной нагрузки в организме пациента и генотипирование РНК вируса методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» (чувствительность — 15 МЕ/мл; уровень вирусной нагрузки считали высоким при количестве копий РНК вируса более 8×10^5 МЕ/мл; оборудование: Rotor Gene-Q, Qiagen, Германия); (3) анализ однонуклеотидных полиморфизмов в локусах *rs8099917* и *rs12979860* гена *IL28B* (реагенты: тест-система «АмплиСенс», «Интерлабсервис», Россия); (4) УЗИ органов гепатобилиарной зоны; (5) фиброэластометрия печени (оборудование: аппарат FibroScan 502 Touch, Echosens, Франция); (6) функциональные пробы печени, протеинограмма, полный анализ крови, общий анализ мочи; (7) УЗИ щитовидной железы и определение уровня тиреотропного гормона, трийодтиронина (Т3), тироксина (Т4), антител к тиреоидной пероксидазе; (8) анализ крови на аутоантитела ANA, AMA, ASMA, LKM по показаниям; (9) осмотр пародонтолога с последующей санацией заболеваний пародонта.

Для оценки безопасности противовирусной терапии в процессе лечения фиксировали все случаи нарушения самочувствия пациентов и отклонений от норм в результатах анализов крови. Выраженность нежелательных явлений оценивали по классификации CTCAE (Common Terminology Criteria for Adverse Events) [6].

Эффективность лечения оценивали по частоте достижения устойчивого вирусологического ответа (УВО) — авиремии через 24 недели после окончания терапии.

Статистическую обработку данных проводили в MS Excel-2007 с использованием критерия Стьюдента (t).

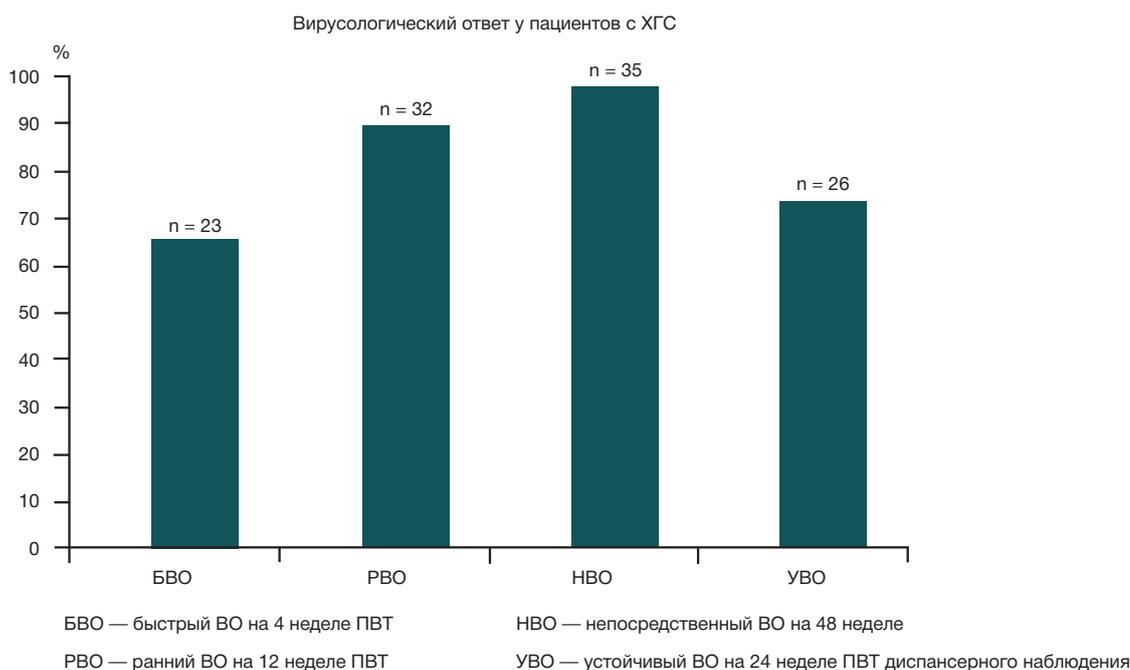
Исследование было одобрено этическим комитетом РКИБ (протокол № 4 от 17.12.2013). Все пациенты дали письменное информированное согласие на участие в исследовании.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

По результатам генотипирования вируса установили, что все 37 пациентов инфицированы вирусом с генотипом 1 (субтип 1b — у 36 пациентов, субтип 1a — у 1 пациента). У 56,8 % участников исследования (n = 21) вирусная нагрузка была низкой. При этом 84 % (n = 31) больных были обследованы по полиморфизмам гена *IL28B*, и у 58 % из них были выявлены благоприятные в случае с ХГС генотипы: СС (*rs12979860*) и ТТ (*rs8099917*).

По данным эластометрии, фиброз отсутствовал (F0 METAVIR) у 48,6 % пациентов; слабо выраженный и умеренный фиброз (F1–F2 METAVIR) наблюдался у 17,1 % и 14,3 % больных соответственно. Выраженный фиброз (F3–4) был выявлен у 20 % пациентов. Больных с циррозом печени не было.

Распределение пациентов по группа по типу вирусологического ответа на различных сроках ПВТ и 24-й неделе диспансерного наблюдения пациентов представлено на рисунке. Быстрый вирусологический ответ (БВО) на 4-й неделе ПВТ наблюдали у 62,2 % больных; ранний вирусологический ответ (РВО) на 12-й неделе ПВТ — у 86,5 %; непосредственный вирусологический ответ (НВО) на 48-й неделе лечения — у 94,6 % больных. Устойчивый вирусологический ответ был достигнут 26 пациентами (70,3 %).



Распределение пациентов по группам по типу вирусологического ответа (каждый пациент мог быть учтен в нескольких группах одновременно в зависимости от характера индивидуальной реакции на терапию)

До начала терапии у большинства пациентов отмечалось повышение активности аланинаминотрансферазы (АЛТ), среднее значение показателя до начала ПВТ составило $76,22 \pm 4,77$ Ед./л. На фоне лечения была отмечена положительная динамика уровня АЛТ: через 4 и 12 недель терапии активность фермента снизилась и составила $38,2 \pm 3,11$ Ед./л ($p < 0,05$) и $31,37 \pm 1,27$ Ед./л ($p < 0,05$) соответственно. На момент окончания лечения у 92 % ($n = 34$) пациентов уровень АЛТ находился в пределах референсных значений.

При оценке безопасности терапии оценивали любые отклонения в самочувствии пациентов и отклонения от норм в результатах анализов крови. Возникавшие в ходе ПВТ нежелательные явления были характерны для интерферона и рибавирина: гриппоподобный и астеновегетативный синдромы (слабость, снижение работоспособности, быстрая утомляемость) наблюдались у 36 больных. Гриппоподобный синдром возникал в начале лечения и быстро купировался после приема нестероидных противовоспалительных препаратов. Кожные реакции (сухость, зуд, сыпь) отмечали 66,7 % пациентов. У 61,2 % больных наблюдались раздражительность, изменение общего фона настроения.

Гематологические показатели свидетельствовали о развитии нейтропении, анемии, тромбоцитопении (таблица). Анемия 1–2 степени по СТСАЕ была зарегистри-

рована у 89,2 % пациентов, нейтропения 1–2 степени — у 89,2 % пациентов. Лишь одной больной в связи с развившейся нейтропенией 3 степени на 4-й неделе ПВТ ($0,6 \times 10^9$ клеток/л) был назначен лейкоцитим по 300 мкг/сут. дважды с интервалом в 7 дней (на фоне лечения уровень нейтрофилов нормализовался). Тромбоцитопения 1–2 степени по СТСАЕ была зарегистрирована у 35,1 % пациентов.

Необходимость в коррекции дозы цепэгИФН альфа-2b в связи с развитием нейтропении возникла при лечении 2 больных, дозы рибавирина вследствие развития анемии — при лечении 3 больных.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Представленные нами результаты указывают на высокую эффективность (70,3 % пациентов с устойчивым вирусологическим ответом) и хороший профиль безопасности комбинированной ПВТ ХГС с включением цепэг-ИФН альфа-2b. Наши данные сопоставимы с результатами опубликованных клинических исследований [6–11]. Так, в рандомизированном сравнительном клиническом исследовании по изучению эффективности и безопасности цепэгИФН альфа-2b в дозах 1,5 и 2,0 мкг/кг в сочетании с рибавирином [6] УВО был достигнут у 71,4 % пациентов (доза 1,5 мкг/кг). В другом исследовании [7] УВО был

Гематологические показатели больных ХГС до, в течение и через 24 недели после ПВТ (данные представлены в виде $M \pm m$, $n = 37$)

Показатели	Срок наблюдения					
	До начала терапии	4 недели терапии	12 недель терапии	24 недели терапии	48 недель терапии	24 недели после терапии
Лейкоциты, $\times 10^9$ клеток/л	$5,5 \pm 0,16$	$3,4 \pm 0,12^{**}$	$3,3 \pm 0,11^{**}$	$2,7 \pm 0,16^{***}$	$2,8 \pm 0,18^{***}$	$4,2 \pm 0,26$
Эритроциты, $\times 10^{12}$ клеток/л	$4,7 \pm 0,06$	$4,0 \pm 0,08$	$3,6 \pm 0,06^*$	$3,4 \pm 0,09^*$	$3,5 \pm 0,08^*$	$4,4 \pm 0,06$
Гемоглобин, г/л	$141,5 \pm 2,0$	$116,0 \pm 3,0^*$	$113,0 \pm 2,9^*$	$111,0 \pm 2,8^{**}$	$112,0 \pm 4,02^{**}$	$137,0 \pm 1,2$
Тромбоциты, $\times 10^9$ клеток/л	$220,0 \pm 8,2$	$161,1 \pm 8,4^*$	$157,0 \pm 9,1^{***}$	$171,5 \pm 8,0^*$	$151,0 \pm 9,96^{**}$	$224,0 \pm 8,1$

Примечание. * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$ при сравнении значений показателей до начала терапии и во время нее.

установлен у 64,6 % пациентов, инфицированных вирусом гепатита С генотипа 1, при этом у пациентов с предикторами благоприятного ответа на ПВТ этот показатель составил 75,0 %.

На фоне лечения серьезных нежелательных явлений зарегистрировано не было, все побочные эффекты были ожидаемы и характерны для пэг-ИФН альфа и рибавирина. Для пациентов, обладающих предикторами благоприятного ответа на ПВТ (слабовыраженный фиброз, низкая вирусная нагрузка, благоприятные полиморфизмы гена *IL28B*, отсутствие тяжелых сопутствующих заболеваний) назначение комбинированной терапии с включением цепэгИФН альфа-2b и рибавирина оправданно.

ВЫВОДЫ

Устойчивый вирусологический ответ на лечение хронического гепатита С цепэгИФН альфа-2b и рибавирином был достигнут у 70,3 % больных, все нежелательные явления были прогнозируемы и не требовали досрочного прекращения лечения. Поскольку в настоящее время в России передовые безинтерфероновые схемы противовирусной терапии малодоступны для широких слоев населения, применение достаточно эффективной и безопасной интерферонсодержащей схемы терапии для пациентов с ХГС, инфицированных вирусом генотипа 1, вполне целесообразно.

Литература

1. European Association for Study of Liver. Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2015. *J Hepatology*. 2015 Jul; 63 (1): 199–236. DOI: 10.1016/j.hep.2015.03.025.
2. Рекомендации по диагностике и лечению взрослых больных гепатитом С (письмо Министерства здравоохранения Российской Федерации № 17-00-6444 от 03.09.2014). М., 2014. 91 с.
3. Еналеева Д. Ш., Фазылов В. Х., Созинов А. С. Хронические вирусные гепатиты В, С и D: руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2015. 192 с.
4. Павлов А. И., Кириллов С. М., Пономаренко Д. С., Хаваншанов А. К., Фадинова Ж. В., Бобкова И. В. и др. Эффективность и безопасность применения цепэгинтерферона альфа-2b в составе двойной схемы (цепэгинтерферон альфа 2b и рибавирин) противовирусной терапии у пациентов с хроническим гепатитом С, генотипами 2 и 3. Опыт реальной клинической практики. *Журнал инфектологии*. 2016; 8 (3): 92–8. DOI: 10.22625/2072-6732-2016-8-3-92-98.
5. Маевская М. В., Знойко О. О., Климова Е. А., Максимов С. Л., Кижло С. Н., Петроченкова Н. А. и др. Эффективность применения препарата пегилированного интерферона альфа-2b «Альгерон» в лечении хронического гепатита С. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2013; 23 (1): 30–6.
6. Маевская М. В., Знойко О. О., Климова Е. А., Максимов С. Л., Кижло С. Н., Петроченкова Н. А. и др. Лечение больных хроническим гепатитом С препаратом цепэгинтерферон альфа-2b в сочетании с рибавирином (Итоговые результаты рандомизированного сравнительного клинического исследования). *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2014; 24 (2): 53–64.
7. Блохина Н. П., Нурмухаметова Е. А., Русанова М. Г., Гагарина И. В., Марьямова Е. С., Кузнецова Н. А. и др. Эффективность и безопасность применения цепэгинтерферона альфа 2b в составе двойной (цепэгинтерферон альфа 2b и рибавирин) и тройной (симепревив, цепэгинтерферон альфа 2b и рибавирин) схемы противовирусной терапии у пациентов с хроническим гепатитом С. Опыт реальной клинической практики. *Журнал инфектологии*. 2016; 8 (2): 48–55.
8. Znoyko O, Mayevskaya MV, Klimova E, Kizhlo S, Petrochenkova N, Maximov S, et al. Rapid and early virologic response to cepeginterferon-alfa-2b in combination with ribavirin in treatment-naïve patients with chronic HCV. *Hepatology*. 2012; 56 (4 Suppl 1): 586A.
9. Znoyko O, Maevskaya M, Klimova E, Kizhlo S, Petrochenkova N, Maximov S, et al. Early virologic response (EVR) in treatment-naïve mono-infected chronic hepatitis C (CHC) patients treated with cepeginterferon-alfa-2b (cePEG-IFN-2b) plus ribavirin. *J Hepatology*. 2013; 58 (Suppl 1): S348–9.
10. Znoyko O, Maevskaya M, Klimova E, Kizhlo S, Petrochenkova N, Maximov S, et al. Cepeginterferon-alfa-2b combination with ribavirin in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C. *J Hepatology*. 2014; 60 (Suppl 1): S476.
11. Знойко О. О., Линькова Ю. Н., Морозова М. А. Клинический опыт применения схемы тройной терапии, включающей цепэгинтерферон альфа-2 b, симепревив и рибавирин, у пациентов с хроническим гепатитом С генотипа 1. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2016; (2): 100–9.

References

1. European Association for Study of Liver. Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2015. *J Hepatology*. 2015 Jul; 63 (1): 199–236. DOI: 10.1016/j.hep.2015.03.025.
2. Rekomendatsii po diagnostike i lecheniyu vzroslykh bol'nykh gepatitom С (Letter of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 17-00-6444 from 03.09.2014). Moscow, 2014. 91 p. Russian.
3. Enaleeva DSh, Fazylov VKh, Sozinov AS. Khronicheskie virusnye gepatity B, C i D: rukovodstvo dlya vrachey. Moscow: GEOTAR-Media; 2015. 192 p. Russian.
4. Pavlov AI, Kirillov SM, Ponomarenko DS, Havanshanov AK, Fadina JV, Bobkova IV, et al. [Efficacy and safety of cepeginterferon alfa-2b in double treatment regimen (cepeginterferon alfa-2b and ribavirin) of antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C genotypes 2 and 3. Experience of real clinical practice]. *Journal Infectology*. 2016; 8 (3): 92–8. DOI: 10.22625/2072-6732-2016-8-3-92-98. Russian.
5. Mayevskaya MV, Znoyko OO, Klimova EA, Maximov AS, Kizhlo SN, Petrochenkova NA, et al. [Efficacy of pegylated interferon alfa-2b «Algeron» in the treatment of chronic hepatitis C]. *The Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*. 2013; 23 (1): 30–6. Russian.
6. Mayevskaya MV, Znoyko OO, Klimova EA, Maximov AS, Kizhlo SN, Petrochenkova NA, et al. [Treatment of chronic hepatitis C by cepeginterferon alpha-2b in combination to ribavirin (Final results of randomized comparative clinical study)]. *The Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*. 2014; 24 (2): 53–64. Russian.
7. Blokhina NP, Nurmuhametova EA, Rusanova MG, Gagarina IV, Mar'jamova ES, Kuznetsova NA, et al. [The efficacy and safety of double (cepeginterferon alfa-2b and ribavirin) and triple (simeprevir, cepeginterferon alfa 2b and ribavirin) treatment regimens in chronic hepatitis C patients. The experience of everyday clinical practice]. *Journal Infectology*. 2016; 8 (2): 48–55. Russian.
8. Znoyko O, Mayevskaya MV, Klimova E, Kizhlo S, Petrochenkova N, Maximov S, et al. Rapid and early virologic response to

- cepeginterferon-alfa-2b in combination with ribavirine in treatment-naïve patients with chronic HCV. *Hepatology*. 2012; 56 (4 Suppl 1): 586A.
9. Znoyko O, Maevskaya M, Klimova E, Kizhlo S, Petrochenkova N, Maximov S, et al. Early virologic response (EVR) in treatment-naïve mono-infected chronic hepatitis C (CHC) patients treated with cepeginterferon-alfa-2b (cePEG-IFNa-2b) plus ribavirin. *J Hepatology*. 2013; 58 (Suppl 1): S348–9.
 10. Znoyko O, Maevskaya M, Klimova E, Kizhlo S, Petrochenkova N, Maximov S, et al. Cepeginterferon-alfa-2b combination with ribavirin in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C. *J Hepatology*. 2014; 60 (Suppl 1): S476.
 11. Znoyko OO, Linkova YuN, Morozova MA. Klinicheskiy opyt primeneniya skhemy troynoy terapii, vlyuchayushchey tsepeginterferon al'fa-2 b, simeprevir i ribavirin, u patsientov s khronicheskim gepatitom C genotipa 1. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obucheniye*. 2016; (2): 100–9. Russian.

ИАГ-ЛАЗЕРНАЯ ПУНКЦИЯ ПРИ ПРЕМАКУЛЯРНОМ КРОВОИЗЛИЯНИИ НА ОБОИХ ГЛАЗАХ У ПАЦИЕНТА С ОСТРЫМ МИЕЛОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

И. А. Малов^{1✉}, Н. В. Стренев¹, Х. П. Тахчиди²

¹ Екатеринбургский центр МНТК «Микрохирургия глаза», Екатеринбург

² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

Премакулярные кровоизлияния могут возникать по различным причинам и вызывают внезапное одно- или двустороннее снижение зрения. Одним из признанных вариантов лечения является ИАГ-лазерная пункция задней гиалоидной мембраны в зоне кровоизлияния. Авторы представляют случай успешной ИАГ-лазерной пункции премакулярных кровоизлияний на обоих глазах с различной локализацией точки пунктирования у 23-летнего пациента с острым миелобластным лейкозом.

Ключевые слова: премакулярное кровоизлияние, ИАГ-лазер, задняя гиалоидная мембрана, острый миелобластный лейкоз

✉ **Для корреспонденции:** Малов Игорь Александрович
ул. Академика Бардина, д. 4а, г. Екатеринбург, 620149; malov64@gmail.com

Статья получена: 10.04.2017 **Статья принята к печати:** 24.04.2017

NG:YAG LASER HYALOIDOTOMY FOR PREMACULAR HEMORRHAGE IN BOTH EYES IN A PATIENT WITH ACUTE MYELOBLASTIC LEUKEMIA

Malov IA^{1✉}, Strennev NV¹, Takhchidi KhP²

¹ Eye Microsurgery Ekaterinburg Center, Ekaterinburg, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Premacular hemorrhage occurs in various disorders and causes sudden unilateral or bilateral visual impairment. One of the well-established techniques to treat this condition is Ng:YAG laser hyaloidotomy. Below we report a case of premacular hemorrhage in the right and left eyes of a 23-year old patient with acute myeloblastic leukemia. Ng:YAG laser hyaloidotomy was successfully performed on both patient's eyes at different puncture sites.

Keywords: premacular hemorrhage, YAG laser, posterior hyaloid membrane, acute myeloblastic leukemia

✉ **Correspondence should be addressed:** Igor Malov
ul. Akademika Bardina 4a, Ekaterinburg, Russia, 620149; malov64@gmail.com

Received: 10.04.2017 **Accepted:** 24.04.2017

Премакулярные кровоизлияния (ПМК) характеризуются внезапным значительным снижением зрения. Причиной ПМК могут быть венозная патология сетчатки (диабетическая ретинопатия, окклюзии вен), возрастная макулярная дегенерация, феномен Вальсальвы, разрыв макроаневризмы и другие [1–6]. Среди больных лейкозами до 49 % имеют геморрагические осложнения на глазном дне, в том числе 6 % — ПМК [7]. В большинстве случаев ПМК разрешаются самостоятельно за несколько недель или месяцев в зависимости от объема кровоизлияния, однако при активном образе жизни, двустороннем кровоизлиянии или кровоизлиянии на единственном зрячем глазу требуется ускорить процесс для зрительной реабилитации пациента. Кроме того, возвращение утраченного зрения оказывает выраженный позитивный психологический эффект у больных этим тяжелым заболеванием. Из известных методов лечения: пневматическая транслокация кровоизлияния с введением тканевого активатора плазминогена [8, 9], витрэктомия [10], ИАГ-лазерная пункция [11–14] — последний является наиболее безопасным и доступным.

Авторы наблюдали 23-летнего пациента с острым миелобластным лейкозом, у которого на обоих глазах возник-

ли ПМК со значительным снижением зрения. Для зрительной реабилитации пациента была выполнена ИАГ-лазерная пункция задней гиалоидной мембраны в зоне ПМК на обоих глазах с интервалом в несколько минут. Данный случай интересен тем, что из-за локализации границы нижнего края ПМК в области фовеа на левом глазу было принято решение выполнить пункцию выше фовеа, чтобы не повредить сетчатку данной зоны. На правом глазу пункция была проведена традиционно у нижнего края ПМК. Дальнейшее наблюдение выявило различия в процессе рассасывания кровоизлияний с разным положением точки пунктирования на обоих глазах у одного пациента.

Описание клинического случая

У пациента 23 лет с диагнозом «острый миелобластный лейкоз» на фоне полихимиотерапии произошло премакулярное кровоизлияние на обоих глазах с резким снижением зрения. На 6-й неделе с момента снижения зрения пациент обратился в нашу клинику. При поступлении острота зрения (Vis) с коррекцией и внутриглазное

давление (ВГД) правого (OD) и левого (OS) глаза составили: Vis OD с корр. = 0,1, Vis OS с корр. = 0,05, ВГД OD = 20 мм рт. ст., ВГД OS = 20 мм рт. ст. На глазном дне обоих глаз в заднем полюсе обнаружены преретинальные кровоизлияния с вовлечением зоны фовеа. Площадь кровоизлияния в области макулы на правом глазу приблизительно 5 диаметров диска зрительного нерва (ДЗН), на левом — 3 диаметра ДЗН. Проведена пункция задней гиалоидной мембраны над кровоизлиянием на обоих глазах за один сеанс ИАГ-лазером VISULAS YAG III (Carl Zeiss Meditec AG, Германия) с длиной волны 1064 нм, диаметром пятна 10 мкм, двумя одиночными импульсами $E = 2$ мДж на каждом глазу с интервалом между операциями несколько минут. Анатомическая локализация центральной ямки (оптический центр) находится приблизительно на 500 мкм книзу от горизонтальной линии, проходящей через центр ДЗН [15]. Точку пункции, по нашим наблюдениям, лучше располагать не ближе 1000 мкм от предполагаемой центральной ямки во избежание ее повреждения. В результате на правом глазу место пункции было выбрано традиционно по нижнему краю кровоизлияния, что оказалось в 2500 мкм книзу от горизонтальной линии (рис. 1, А). Поскольку на левом глазу нижний край кровоизлияния находился в фовеа, было решено выбрать точку пунктирования на 1000 мкм выше фовеа, т. е. на 500 мкм выше от горизонтальной линии (рис. 1, Б).

Через неделю после лазерной пункции: Vis OD с корр. = 0,7, Vis OS с корр. = 0,08, ВГД OD = 19 мм рт. ст., ВГД OS = 19 мм рт. ст. На обоих глазах наблюдались остатки кровоизлияний в зоне макулы (рис. 2, А). По данным оптической когерентной томографии (ОКТ), проведенной на томографе Avanti RTVue 100 (Optovue, США): правый глаз — высокорекфлексивные включения в стекловидном теле, отверстие в задней гиалоидной мембране стекловидного тела с ее частичной отслойкой; левый глаз — высокорекфлексивные включения над фовеолой (остатки крови), отверстие в задней гиалоидной мембране стекловидного тела с ее частичной отслойкой (рис. 3, А). Через 5 нед. после лазерной пункции: Vis OD с корр. = 0,7, Vis OS с корр. = 0,1, ВГД OD = 18 мм рт. ст., ВГД OS = 16 мм рт. ст. Полное рассасывание кровоизлияний в макуле правого глаза, небольшие остатки кровоизлияния в фовеа левого глаза (рис. 2, Б). Через 14 нед. после лазерной пункции: Vis OD с корр. = 1,0, Vis OS с корр. = 0,6, ВГД OD = 18 мм рт. ст., ВГД OS = 16 мм рт. ст. Полное рассасывание кровоизлияний в макуле правого глаза, небольшие остатки кровоизлияния в макуле левого глаза (рис. 2, В). По данным ОКТ, практически полное разрешение высокорекфлексивных включений над фовеа обоих глаз (рис. 3, Б). В дальнейшем острота зрения обоих глаз не изменилась.

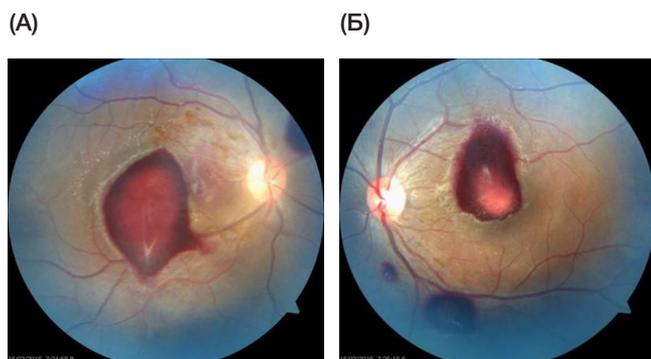


Рис. 1. Фундус-фото правого (А) и левого (Б) глаза пациента при поступлении

Обсуждение клинического случая

Лечение премакулярных кровоизлияний методом ИАГ-лазерной пункции задней гиалоидной мембраны достаточно эффективно и безопасно. Общепринято выполнение пункции по нижнему краю кровоизлияния, так обеспечивается максимально быстрая эвакуация крови под действием силы тяжести и колебаний отслоенной задней гиалоидной мембраны над кровоизлиянием, связанных с колебанием стекловидного тела при физиологических движениях глаза. При этом точка пунктирования должна быть максимально удалена от фовеа, чтобы избежать повреждения последней. В представленном случае показания к лазерной пункции на правом глазу не вызвали сомнений. На левом глазу традиционная лазерная пункция по нижнему краю кровоизлияния была рискована из-за локализации предполагаемой точки пунктирования в проекции фовеа. Поэтому было принято решение выполнить лазерную пункцию выше фовеа. Очевидно, что при такой локализации вмешательства сила тяжести не будет способствовать эвакуации крови из части кровоизлияния, расположенной ниже пункции. Однако мы предположили, что эвакуация крови из этой зоны будет происходить за счет колебательных движений отслоенной задней гиалоидной мембраны над кровоизлиянием, вызванных колебательными движениями стекловидного тела при физиологических

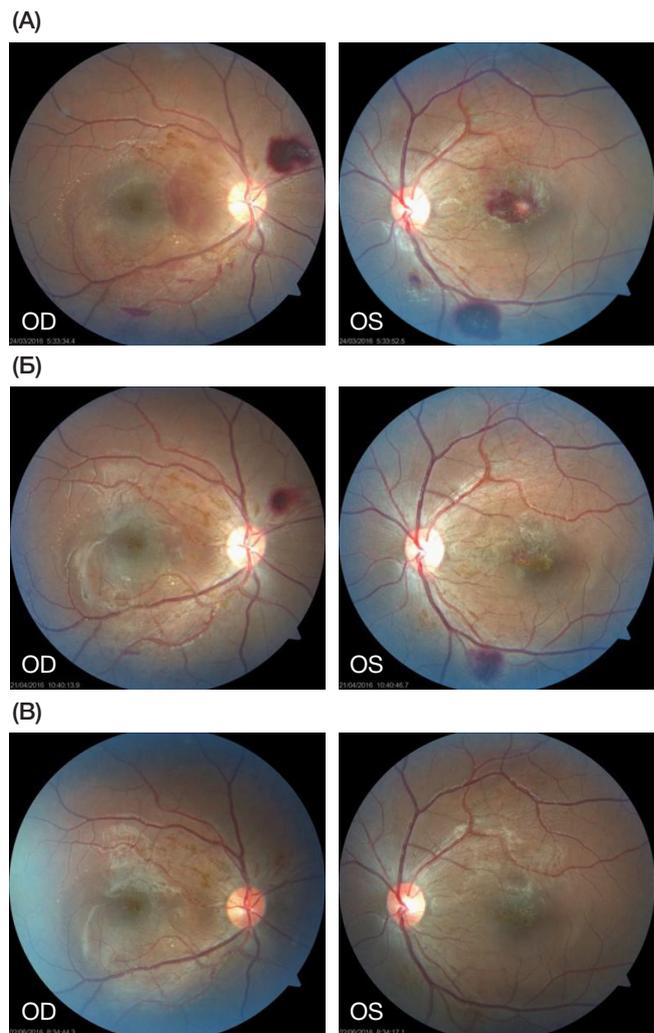


Рис. 2. Фундус-фото правого (OD) и левого (OS) глаза пациента через (А) 1 нед., (Б) 5 нед. и (В) 14 нед. после ИАГ-лазерной пункции задней гиалоидной мембраны

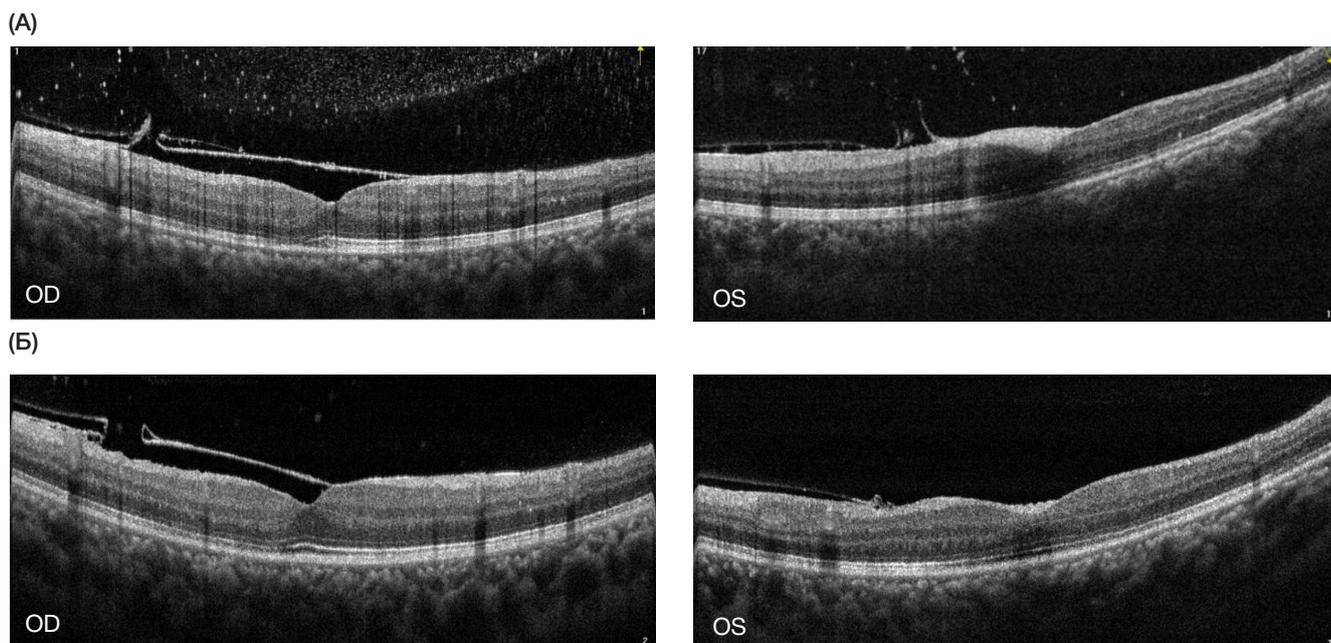


Рис. 3. Оптическая когерентная томограмма макулярной области правого (OD) и левого (OS) глаза пациента через (A) 1 нед. и (B) 14 нед. после ИАГ-лазерной пункции задней гиалоидной мембраны

движениях глаза. Динамическое наблюдение пациента подтвердило наши предположения. Однако, как и ожидалось, рассасывание кровоизлияния на левом глазу происходило значительно медленнее (на 1 мес.), чем на правом, несмотря на исходно меньший объем кровоизлияния.

ВЫВОДЫ

Лечение премакулярных кровоизлияний методом ИАГ-лазерной пункции задней гиалоидной мембраны над кровоизлиянием эффективно и безопасно, в том числе у паци-

ентов с острым миелобластным лейкозом, проходящим химиотерапию.

Представленный случай демонстрирует возможность лечения премакулярного кровоизлияния с локализацией его нижнего края в фовеа методом лазерной пункции, при этом точку пунктирования следует располагать выше фовеа.

Рассасывание крови в этом случае происходит на 1 мес. медленнее, чем при использовании традиционного метода с локализацией точки пунктирования по нижнему краю кровоизлияния.

Литература

- Punjabi OS, Flynn HW Jr, Knighton RW, Gregori G, Couvillion SS, Lalwani GL, et al. Spectral domain optical coherence tomography for proliferative diabetic retinopathy with subhyaloid hemorrhage. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. 2008 Nov-Dec; 39 (6): 494–6.
- Buliga S, Toma C, Taina A, Beraru V, Benone C. [Diabetic retinal hemorrhage — invasive minimal treatment]. *Oftalmologia*. 2011; 55 (4): 82–5. Romanian.
- Kashani S, Aslam SA, Bessant D. Valsalva retinopathy presenting with subhyaloid haemorrhage. *Emerg Med J*. 2009 Jan; 26 (1): 74.
- Gedik S, Gür S, Yilmaz G, Akova YA. Retinal arterial macroaneurysm rupture following fundus fluorescein angiography and treatment with Nd:YAG laser membranectomy. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. 2007 Mar-Apr; 38 (2): 154–6.
- Völcker D, Junker B, Hansen LL. [Spontaneous macula hemorrhage. Subhyaloid/sub-inner limiting membrane (ILM)]. *Ophthalmologie*. 2012 Jul; 109 (7): 702–6. German.
- Mansour AM, Lee JW, Yahng SA, Kim KS, Shahin M, Hamerschlak N, et al. Ocular manifestations of idiopathic aplastic anemia: retrospective study and literature review. *Clin Ophthalmol*. 2014 Apr 17; 8: 777–87.
- Reddy SC, Jackson N. Retinopathy in acute leukaemia at initial diagnosis: correlation of fundus lesions and haematological parameters. *Acta Ophthalmol Scand*. 2004 Feb; 82 (1): 81–5.
- Conway MD, Peyman GA, Recasens M. Intravitreal tPA and SF6 promote clearing of premacular subhyaloid hemorrhages in shaken and battered baby syndrome. *Ophthalmic Surg Lasers*. 1999 Jun; 30 (6): 435–41.
- Koh HJ, Kim SH, Lee SC, Kwon OW. Treatment of subhyaloid haemorrhage with intravitreal tissue plasminogen activator and C3F8 gas injection. *Br J Ophthalmol*. 2000 Nov; 84 (11): 1329–30.
- Ramsay RC, Knobloch WH, Cantrill HL. Timing of vitrectomy for active proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmology*. 1986 Mar; 93 (3): 283–9.
- Цуко А. Г., Старунов Э. В., Малышев В. В. Nd:YAG-лазерная гиалоидо/ретиномомия в лечении макулярных кровоизлияний. В кн.: Сборник тезисов докладов II Всероссийского семинара «Макула-2006». Ростов-на-Дону: ИнтерЮНА; 2006. с. 398–400.
- Магарамов Д. А. Эффективность лазерных методов лечения пациентов при обширных кровоизлияниях в центральной зоне сетчатки. В кн.: Тахчиди Х. П., Малюгин Б. Э., Лыскин П. В., Климова Т. Л., Пронина И. И., редакторы. Современные технологии лечения витреоретинальной патологии-2007: сборник научных статей по материалам научно-практической конференции; 23 марта 2007 г.; Москва, Россия. М.: МНТК «Микрохирургия глаза»; 2007. с. 151–4.
- Погодина Е. Г., Илюхин Д. А. Два клинических случая с применением методики ИАГ-лазерной гиалоидотомии. *Вестн.*

- ОГУ. 2012; 148 (12): 155–7.
14. Канюков В. Н., Погодина Е. Г., Канюкова Ю. В., Илюхин Д. А. Опыт применения гиалоидо- и ретинопунктуры при макулярных кровоизлияниях различной этиологии. Со-
временные технологии в офтальмологии. 2014; (1): 55–6.
15. Blanks JC. Morphology and Topography of the Retina. In: Ryan SJ, editor. Retina. 3rd ed. St. Lois: Mosby; 2001. vol. 1. p. 32–53.

References

- Punjabi OS, Flynn HW Jr, Knighton RW, Gregori G, Couvillion SS, Lalwani GL, et al. Spectral domain optical coherence tomography for proliferative diabetic retinopathy with subhyaloid hemorrhage. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. 2008 Nov–Dec; 39 (6): 494–6.
- Buliga S, Toma C, Taina A, Beraru V, Benone C. [Diabetic retinal hemorrhage — invasive minimal treatment]. *Oftalmologia*. 2011; 55 (4): 82–5. Romanian.
- Kashani S, Aslam SA, Bessant D. Valsalva retinopathy presenting with subhyaloid haemorrhage. *Emerg Med J*. 2009 Jan; 26 (1): 74.
- Gedik S, Gür S, Yılmaz G, Akova YA. Retinal arterial macroaneurysm rupture following fundus fluorescein angiography and treatment with Nd:YAG laser membranectomy. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. 2007 Mar–Apr; 38 (2): 154–6.
- Völcker D, Junker B, Hansen LL. [Spontaneous macula hemorrhage. Subhyaloid/sub-inner limiting membrane (ILM)]. *Ophthalmologie*. 2012 Jul; 109 (7): 702–6. German.
- Mansour AM, Lee JW, Yahng SA, Kim KS, Shahin M, Hamerschlak N, et al. Ocular manifestations of idiopathic aplastic anemia: retrospective study and literature review. *Clin Ophthalmol*. 2014 Apr 17; 8: 777–87.
- Reddy SC, Jackson N. Retinopathy in acute leukaemia at initial diagnosis: correlation of fundus lesions and haematological parameters. *Acta Ophthalmol Scand*. 2004 Feb; 82 (1): 81–5.
- Conway MD, Peyman GA, Recasens M. Intravitreal tPA and SF6 promote clearing of premacular subhyaloid hemorrhages in shaken and battered baby syndrome. *Ophthalmic Surg Lasers*. 1999 Jun; 30 (6): 435–41.
- Koh HJ, Kim SH, Lee SC, Kwon OW. Treatment of subhyaloid haemorrhage with intravitreal tissue plasminogen activator and C3F8 gas injection. *Br J Ophthalmol*. 2000 Nov; 84 (11): 1329–30.
- Ramsay RC, Knobloch WH, Cantrill HL. Timing of vitrectomy for active proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmology*. 1986 Mar; 93 (3): 283–9.
- Shchuko AG, Starunov EV, Malyshev VV. ND:YAG-lazernaya gialoido/retinotomiya v lechenii makulyarnykh krovoizliyanii. In: *Sbornik tezisov dokladov II Vserossiiskogo seminarra «Makula-2006»*. Rostov-on-Don: InterYuNA; 2006. p. 398–400. Russian.
- Magaramov DA. Effektivnost' lazernykh metodov lecheniya patsientov pri obshirnykh krovoizliyaniyakh v tsentral'noi zone setchatki. In: Takhchidi KhP, Malugin BE, Lyskin PV, Klimova TL, Pronina II, editors. *Sovremennye tekhnologii lecheniya vitreoretinal'noi patologii-2007: sbornik nauchnykh statei po materialam nauchno-prakticheskoi konferentsii*; 2007 Mar 23; Moscow, Russia. Moscow: Eye Microsurgery Ekaterinburg Center; 2007. p. 151–4. Russian.
- Pogodina YeG, Ilyukhin DA. [Two clinical cases with application of YAG-laser hyaloidotomy methods]. *Vestnik of the Orenburg State University*. 2012; 148 (12): 155–7. Russian.
- Kanyukov VN, Pogodina EG, Kanyukova YuV, Ilyukhin DA. Opyt primeneniya gialoido- i retinopunktury pri makulyarnykh krovoizliyaniyakh razlichnoi etiologii. *Sovremennye tekhnologii v oftal'mologii*. 2014; (1): 55–6. Russian.
- Blanks JC. Morphology and Topography of the Retina. In: Ryan SJ, editor. Retina. 3rd ed. St. Lois: Mosby; 2001. vol. 1. p. 32–53.

ВОЗМОЖНА ЛИ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ У РАСТЕНИЙ?

Е. Б. Гугля¹✉, А. А. Котлобай², Е. К. Секретова³, П. В. Волкова³, И. В. Ямпольский^{1,2}¹Лаборатория химии природных соединений, НИИ трансляционной медицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва²Группа синтеза природных соединений, Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва³Московская гимназия на Юго-Западе № 1543, Москва

На основе открытого недавно механизма биолюминесценции высших грибов и сходства структуры люциферина грибов и некоторых метаболитов растений поставлена задача поиска растений, содержащих субстрат(ы) реакции грибной люминесценции. В результате скрининга коллекции растений европейской части России обнаружено 10 видов, экстракты листьев которых проявляют биолюминесцентную активность. Установлено, что изученные виды растений синтезируют не одно, а множество активных соединений. Все люминесцентные субстраты, содержащиеся в растениях, не идентичны грибному люциферину (3-гидрокси-гиспидину) и химически нестабильны, что препятствует выделению индивидуальных соединений. Данное исследование можно считать первым шагом в создании автономно люминесцентного растения на базе фермент-субстратной системы высших грибов.

Ключевые слова: биолюминесценция грибов, люминесцентные биоинженерные растения, люциферины, метаболиты растений

Финансирование: работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 14-50-00131.

Благодарности: авторы благодарят Людмилу Абрамову и Никиту Тихомирова за помощь при сборе и определении образцов растений. Работа выполнена с использованием оборудования центра коллективного пользования ИБХ РАН (ЦКП ИБХ).

✉ **Для корреспонденции:** Гугля Елена Борисовна
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; eguglya@gmail.com

Статья получена: 19.02.2017 **Статья принята к печати:** 10.04.2017

BIOLUMINESCENCE: IS IT POSSIBLE FOR A PLANT?

Guglya EB¹✉, Kotlobay AA², Sekretova E³, Volkova PV³, Yampolsky IV^{1,2}¹Laboratory of Chemistry of Natural Compounds, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia²Total Synthesis Laboratory, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia³Moscow South-West High School No. 1543, Moscow, Russia

An extensive collection of plants gathered in the European part of Russia was screened for a substrate of fungal luciferase. This work was inspired by the recently discovered mechanism of bioluminescence in higher fungi and the structural similarity of fungal luciferin with some plant metabolites. Of all studied leaf extracts obtained from 200 different plants, bioluminescent activity was discovered in 10 species. Each of these species contained a plurality of active compounds. All the luminescent substrates were not identical to fungal luciferin (3-hydroxyhispidin) and were chemically unstable, rendering the attempt to isolate individual compounds for further structural characterization yet unsuccessful. This study is the first step towards engineering a self-luminescent plant based on a fungal enzyme-substrate bioluminescent system.

Keywords: fungal bioluminescence, engineered luminescent plants, luciferins, plant metabolites

Funding: this work was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 14-50-00131).

Acknowledgements: the authors thank Lyudmila Abramova and Nikita Tikhomirov for their assistance in collecting and sorting plant samples. The present research was carried out at the facilities of the Shared Resource Center of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry.

✉ **Correspondence should be addressed:** Elena Guglya
ul. Ostrovityanova, 1, Moscow, Russia, 117997; eguglya@gmail.com

Received: 19.02.2017 **Accepted:** 10.04.2017

Биолюминесценция (БЛ) — это видимое свечение живых организмов. Этот феномен был впервые продемонстрирован *in vitro* более ста лет назад Dubois [1]. Исследователь смешивал полученные холодным и горячим способами вытяжки из тканей светящихся органов жуков *Pyrophorus noctilucus*. Экстракт, приготовленный в холодной воде, содержал термолабильный фермент люциферазу, а полученный в горячей воде экстракт содержал термостабильный люциферин. Таким образом, испускание света смесью двух экстрактов было результатом фермент-субстратной

реакции. Термин «биолюминесценция» впервые использовал Harvey [2]. Во всех известных биолюминесцентных системах в реакции участвует кислород, в результате происходит образование продукта реакции — оксильюциферина. Переход молекулы оксильюциферина из возбужденного состояния в основное сопровождается световым излучением.

Биолюминесценция широко распространена в царствах животных и грибов, но люминесцентного растения в природе не известно ни одного [3]. Более 30 лет назад

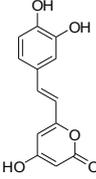
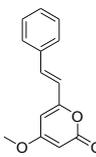
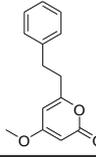
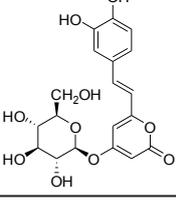
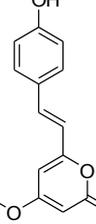
была предпринята первая попытка создания искусственного светящегося растения [4]. На основе хорошо изученной БЛ системы светляка было получено биоинженерное растение *Nicotiana tabacum* путем внедрения в него гена люциферазы. При смешении экстракта такого растения и раствора люциферина и АТФ или же при погружении интактного растения в указанный раствор обнаруживалось БЛ свечение. Изображение светящегося растения было продемонстрировано при его экспозиции на рентгеновской пленке. Позже было выполнено еще несколько работ [5, 6], а недавно даже открыт проект по созданию светящегося растения [7], но принципиально новых результатов не было получено. Результаты наших последних исследований БЛ высших грибов дали основание полагать, что можно достичь большего, используя особенности этой фермент-субстратной системы.

Если у животных биолюминесцентные системы специфичны для каждого таксона, то механизм люминесценции высших грибов, напротив, единообразен [8]. В 1961 г. в БЛ грибов было выделено два этапа [9]. Сначала предшественник люциферина восстанавливается НАД(Ф)Н-зависимым ферментом в истинный люциферин, который затем окисляется кислородом воздуха в результате катализируемой люциферазой реакции и производит видимое световое излучение с длиной волны 520–530 нм [10]. После многочисленных безуспешных попыток [11, 12] предшественник люциферина все же был выделен из плодового тела нелюминесцентного гриба *Pholiota squarrosa*; им оказался гиспидин (6-(3,4-дигидроксистирил)-4-гидрокси-2-пиранон) [13] — хорошо известный вторичный метаболит растений и грибов [14] (табл. 1). В этой же работе гиспидин удалось энзиматически преобразовать в люциферин, который оказался 3-гидроксилированным производным гиспидина [13] (рис. 1).

Из литературных источников известны работы по выделению гиспидина и его производных из таких растений, как *Alpinia zerumbet* [15–17], *Pistacia atlantica* [18], *Peganum harmala* [19], *Pteris ensiformis Burm* [20], *Cassia alata* [21], *Rheum tataricum* [22] и прочих (табл. 1). Широкая распространенность гиспидина среди растений и грибов, а также существование похожих соединений среди метаболитов растений натолкнуло нас на мысль о возможности создания автономно люминесцентного биоинженерного растения путем внедрения гена люциферазы в растение, способное синтезировать субстрат этого фермента. Как и другие метаболиты растений, производные гиспидина сейчас являются объектом пристального внимания ис-

следователей, работающих в области фармацевтики. Гиспидин и его производные проявляют биологическую активность, имеют антиоксидантные и противоопухолевые свойства, а также способны предотвращать ожирение, и они рассматриваются в качестве возможной основы для разработки лекарственных средств [16–19].

Таблица 1. Растения, содержащие гиспидин и его производные

Наименование соединения	Структура	Растение	Ссылка
Гиспидин		<i>Alpinia zerumbet</i>	[15–17]
		<i>Pistacia atlantica</i>	[18]
		<i>Peganum harmala</i>	[19]
5,6-Дегидрокаваин		<i>Alpinia zerumbet</i>	[15–17]
Дигидро-5,6-дегидрокаваин		<i>Alpinia zerumbet</i>	[15–17]
Гиспидин 4-О-β-D-глюкопиранозид		<i>Pteris ensiformis Burm</i>	[20]
Бис-норянгонин		<i>Cassia alata</i>	[21]
		<i>Rheum tataricum</i>	[22]

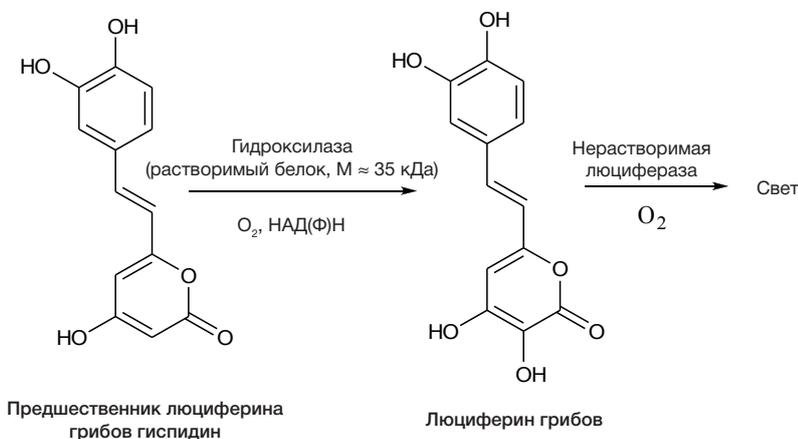


Рис. 1. Механизм люминесценции грибов

Целью нашей работы был поиск субстрата(ов) реакции грибной биоломинесценции в растениях, произрастающих в европейской части России, и выделение соответствующих активных соединений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экстракты растений

Все образцы растений были собраны в июне 2015 г. на биостанции «Озеро Молдино» Московской гимназии на Юго-Западе № 1543 (Тверская область) (табл. 1S, представлена в электронной версии статьи на сайте журнала). Собирали только листья. Все образцы были заморожены и хранились при температуре -70°C ; некоторые были высушены под вакуумом.

При первоначальном скрининге растений в качестве растворителя был использован ацетон. Извлечение целевых компонентов из растительного сырья — хорошо разработанная группа методов [23]. Для получения экстракта часть листа весом 30–500 мг помещали в пробирку объемом 2 мл, содержащую 0,3–1,5 мл растворителя, и смешивали в течение 20 мин в шейкере BioShake XP (Analytik Jena AG, Германия) при скорости 1800 об/мин при комнатной температуре. Затем экстракт переносили в другую пробирку и центрифугировали при температуре 5°C и ускорении 10 000 g на центрифуге Centrifuge 5424 R (Eppendorf, Германия). После чего полученный раствор мог быть использован для твердофазной экстракции (ТФЭ) или разделения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) или же высушен в вакууме на центрифуге miVac Duo (SP Scientific, США). Перед проведением дальнейших операций высушенный остаток повторно растворяли в соответствующем растворителе и центрифугировали. Состав экстрагирующего растворителя для высушенного остатка мог быть отличен от растворителя при первой экстракции, в частности, к органическому растворителю добавляли буферный раствор.

Для выполнения ТФЭ использовали картриджи C18 (500 мг; Phenomenex, США). На картридж наносили исходный экстракт объемом 0,5–1 мл, затем производили смыв образца с сорбента, последовательно меняя состав растворителей (каждая ступень объемом 1–2 мл): вначале смесь ацетонитрила и воды в соотношении 1 : 1, затем ацетонитрилом и ацетоном.

Ферментные экстракты грибов были приготовлены, как описано в работе [13].

Биоломинесцентный анализ

Для анализа смешивали два компонента: экстракт грибного фермента и органический растительный экстракт. Разбавленный экстракт ферментов гриба в объеме 3 мкл и органический растительный экстракт в объеме 3, 10 или 15 мкл добавляли в пробирку, содержащую 100 мкл буфера (при концентрации NaH_2PO_4 0,2 М и Na_2SO_4 0,5 М и pH 8,0) с 0,1 % N-додецил- β -D-мальтозида, смесь взбалтывали и немедленно помещали в кювету люминометра Glomax 20/20 (Promega, США). Люминесценцию измеряли в течение 10 с; время интегрирования сигнала составляло 1 с (табл. 2). В качестве органических экстрактов, содержащих потенциальный субстрат, тестировались экстракты из листьев, экстракты из сушеных остатков первых экстрактов, фракции после ТФЭ или же фракции после ВЭЖХ.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Разделение методом ВЭЖХ проводили на хроматографе Nexera X2 (Shimadzu, Япония), оснащенном автодозатором SIL-30AC, диодно-матричным детектором SPD-M20A и коллектором фракций FRC-10A. Были использованы разные хроматографические колонки (табл. 3). Колонки и детектор не термостатировались (находились при комнатной температуре), температура автодозатора составляла 5°C . Состав подвижной фазы: компонент А — водный раствор ацетата аммония в концентрации 0,02 М

Таблица 2. Образцы для измерения биоломинесценции

Рисунок/таблица	Приготовление образца	Растворитель/общий объем, мкл	Объем для измерения, мкл
Табл. 4	Экстракт замороженных листьев, из 100 мг	Ацетон/300	3
Рис. 2	Экстракт мороженых листьев <i>P. natans</i> в ацетоне, из 100 мг, объем экстракта 300 мкл, высушен и растворен повторно	Растворитель АВ*/100	3
Рис. 3; 4, А, Б (синий)	Экстракты сухих листьев <i>R. nigrum</i> (А) и <i>B. pendula</i> (Б), из 100 мг	EtOH/1000 MeOH/1000	3 3
Рис. 3; 4, А, Б (красный)	ТФЭ фракции тех же экстрактов	Ацетон/1000	3
Рис. 3; 4, В	Экстракт листьев <i>B. pendula</i> , из 100 мг свежих и мороженых, из 50 мг сушеных	MeOH/1000	10
Рис. 4	ВЭЖХ фракции экстракта <i>B. pendula</i> , 500 мкл, высушены и растворены повторно	MeOH/50	10
Рис. 5	ВЭЖХ фракции экстракта <i>P. natans</i> , 1000 мкл, высушены и растворены повторно	Растворитель АВ/100	10
Рис. 6	ВЭЖХ фракции экстракта <i>B. pendula</i> , 1000 мкл, высушены и растворены повторно	MeOH/50	10
Рис. 7	ВЭЖХ фракции экстракта <i>P. natans</i> , 300 мкл, высушены и растворены повторно	Растворитель АВ/50	15
Рис. 8, А	ВЭЖХ фракции экстракта <i>P. natans</i> , 500 мкл	Элюент для ВЭЖХ/500	10
Рис. 8, Б	ВЭЖХ фракции экстракта <i>P. natans</i> , 500 мкл	Элюент для ВЭЖХ/500	10

Примечание. * — АВ, бинарный растворитель (А — ацетон, В — 0,1 М NH_4Ac , pH 6,5).

при pH 5,5, компонент В — ацетонитрил, метанол или ацетон (состав и градиент подвижной фазы представлены в табл. 3). Ацетонитрил и метанол были со степенью чистоты «для ВЭЖХ», ацетон — «х. ч.».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для обнаружения люцифериноподобных субстратов в taxonomически различных растениях был проведен скрининг собранной коллекции 200 образцов. Каждый приготовленный растительный органический экстракт смешивали с раствором грибного фермента и сразу же измеряли его люминесценцию. В итоге было обнаружено 10 люминесцирующих образцов растений (табл. 4).

Если для первоначального скрининга мы использовали один растворитель — ацетон, то для достижения максимальной люминесценции образца с обнаруженным активным субстратом состав растворителей варьировали. Это приводило к некоторой количественной разнице в наблюдаемых значениях БЛ. Высушивание экстракта и повторное растворение в меньшем объеме растворителя позволяло сконцентрировать образец в несколько раз. Для повторного растворения сухого остатка к органическому растворителю мог быть добавлен буфер с тем или иным значением pH, причем значение pH могло быть критичным для сохранности активности экстракта. Так, для работы с замороженными листьями *P. natans* наилучшими

оказались следующие условия: экстракция ацетоном из растения (первый экстракт) и использование смеси ацетона с водно-ацетатным буфером (pH 6,5) в соотношении 7 : 3 для повторного растворения сухого остатка (рис. 2).

Все экстракты люминесцентно активных растений были проверены на стабильность. Они были высушены и растворены повторно, затем выдержаны в течение нескольких часов при температуре 0 °С и при комнатной температуре. Измерение БЛ активности после каждой операции показало, что все субстраты нестабильны (табл. 4). В результате сушки люминесцентная активность снижалась более чем на 50 %. Самая большая величина интенсивности биолюминесценции была установлена для экстракта *P. natans*, и она уменьшилась на порядок после того, как экстракт выдержали некоторое время при комнатной температуре.

При выдержке экстрактов на льду обнаружено заметное увеличение во времени БЛ активности экстрактов, по крайней мере в течение нескольких часов. Его наблюдали для многих образцов растений (табл. 4, рис. 3, А, Б). В частности, для *R. nigrum* зафиксировано 10-кратное увеличение. Временные зависимости биолюминесцентной активности различались не только для разных видов растений, но и для экстрактов одного вида, полученных из растительного материала, обработанного по-разному (свежих, сушеных и замороженных листьев), а также экстрактов и полученных методом ТФЭ фракций тех же экстрактов. Экстракты сухих листьев *B. pendula* проявили

Таблица 3. Параметры ВЭЖХ

Рисунок	Колонка	Подвижная фаза*, компонент В	Образец
5	Discovery C18, 5 мкм, 4,6 × 150 мм	MeCN, градиент 30–90 % при 0–5 мин, 90 % при 5–10 мин, скорость потока 1 мл/мин	Замороженные листья <i>P. natans</i> , 300 мг в 1 мл ацетона, 500 мкл экстракта высушено и растворено в 130 мкл бинарного растворителя, объем на колонку 100 мкл
6	ZORBAX SB-C18, 5 мкм, 9,4 × 150 мм	MeOH, градиент 60–100 % при 0–6 мин, 100 % при 6–45 мин, скорость потока 2 мл/мин	Свежие листья <i>B. pendula</i> , 400 мг в 1500 мкл MeOH; фракция после ТФЭ, ввод на колонку 800 мкл активной фракции в MeCN
7	TSK ODS-120T, 5 мкм, 4,6 × 250 мм	Ацетон, градиент 40–90 % при 0–7 мин, 90 % при 7–30 мин, скорость потока 1 мл/мин	Высушенные листья <i>P. natans</i> , 50 мг в 500 мкл бинарного растворителя, объем на колонку 200 мкл
8, А	Lichrosorb Diol, 10 мкм, 4,6 × 250 мм	MeCN, градиент 90–80 % при 0–7 мин, скорость потока 1 мл/мин	Замороженные листья <i>P. natans</i> , 70 мг на 200 мкл ацетона, объем на колонку 100 мкл
8, Б	Synergi Polar RP 80A, 4 мкм, 2 × 150 мм	MeCN, градиент 70–95 % при 0–5 мин, 95 % при 5–14 мин, скорость потока 0,7 мл/мин	Фракция между 3 и 3,5 мин первой хроматографии, сконцентрированная до 100 мкл

Примечание. * — компонент А — 0,02 М NH₄Ac, pH 5,5.

Таблица 4. Биолюминесцентная активность экстрактов растений

Растение	Интенсивность люминесценции экстракта замороженных листьев, отн. ед.	Интенсивность люминесценции переработанного экстракта, %		
		в сравнении с исходным экстрактом	после выдержки в течение 2 ч при 20 °С в сравнении с люминесценцией до этой процедуры	после выдержки в течение 2 ч при 0 °С в сравнении с люминесценцией до этой процедуры
<i>Andromeda polifolia</i>	6 600	30	35	нет данных
<i>Betula pendula</i>	11 500	25	40	90
<i>Chamaedaphne calyculata</i>	7 900	35	40	120
<i>Potamogeton natans</i>	290 000	25	6	150
<i>Pyrola rotundifolia</i>	1 500	55	70	130
<i>Ribes nigrum</i>	11 000	40	30	330
<i>Ribes rubrum</i>	8 500	35	20	140
<i>Salix aurita</i>	11 000	20	15	нет данных
<i>Salix pentandra</i>	10 000	30	15	60
<i>Stachys sylvatica</i>	11 000	20	25	нет данных

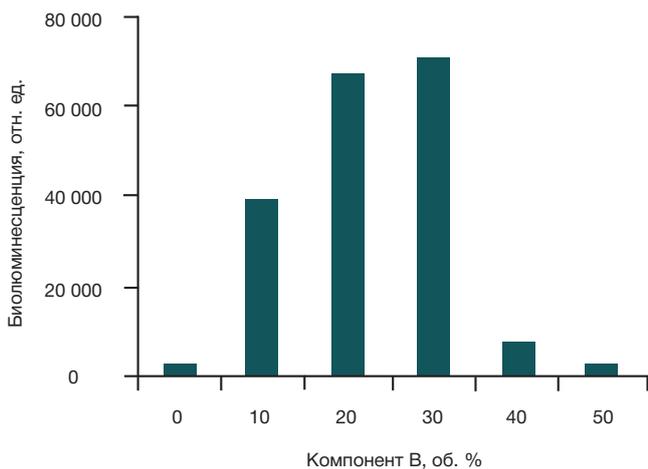


Рис. 2. Зависимость биоломинесценции от содержания компонента В в бинарном растворителе АВ (А — ацетон, В — 0,1 М NH₄Ac, pH 6,5) для высушенного и повторно растворенного экстракта *P. natans*

стабильность, зато уровень биоломинесценции экстрактов замороженных и свежих листьев значительно увеличился (рис. 3, В). Кроме того, часто (но не всегда) 10-секундные кинетические кривые при измерении БЛ экстрактов *B. pendula* были восходящими, хотя обычно они являются нисходящими (рис. 4).

Основываясь на том, что самое большое значение люминесценции исходного экстракта было зафиксировано у образцов *P. natans*, этот вид был выбран в качестве кандидата для продолжения эксперимента, а именно выделения биоломинесцентного субстрата методом ВЭЖХ. Оптимизированный состав подвижной фазы для ВЭЖХ на колонке типа С18 отличался по сравнению с условиями для выделения 3-гидроксигиспидина: как компонент А использовали водно-ацетатный буфер в концентрации 0,02 М при pH 5,5 (в отличие от 0,1 % муравьиной кислоты для 3-гидроксигиспидина). Содержание органического компонента В было увеличено и при градиентном элюировании достигало 95 %.

Фракции после ВЭЖХ были высушены вакуумно, заново растворены с 20-кратным концентрированием, после чего была измерена их БЛ активность (рис. 5). В полученном хроматографическом профиле образца были отмечены две области, содержащие люминесцентно активные компоненты, что указывало на содержание более чем одного субстрата. Контур ультрафиолетового/видимого излучения в диапазоне 200–800 нм свидетельствовал о наличии многих неразделенных компонентов в областях люминесцентной активности.

Для получения большего количества нестабильного субстрата при хроматографировании мы вносили различные модификации в используемый нами метод, а также выбирали для тестирования другие виды растений. На рис. 6 показан результат одного из разделений. В качестве материала использованы свежие листья *B. pendula*. Исходный экстракт из 400 мг листьев экстрагировали в 1500 мкл метанола и 1000 мкл этого экстракта фракционировали на картриджах С18. Была измерена активность фракций, и самая активная из них в объеме 800 мкл без предварительного высушивания была внесена на полупрепаративную колонку С18. После измерения БЛ активности фракций на 45-минутной хроматограмме было выявлено много активных зон. В самых активных фракциях в начале хроматограммы обнаружались многочисленные

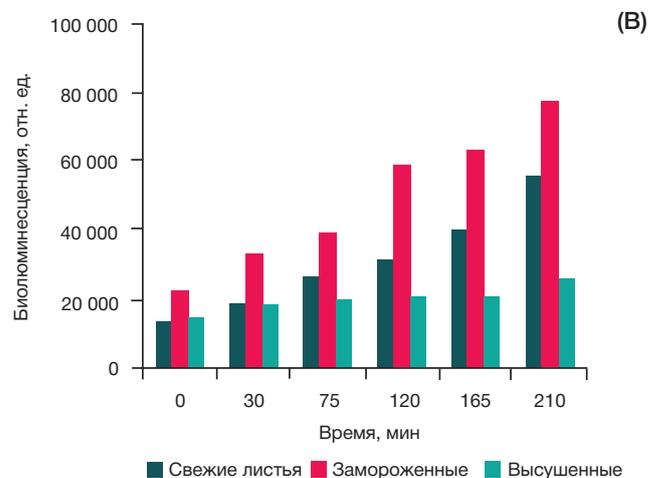
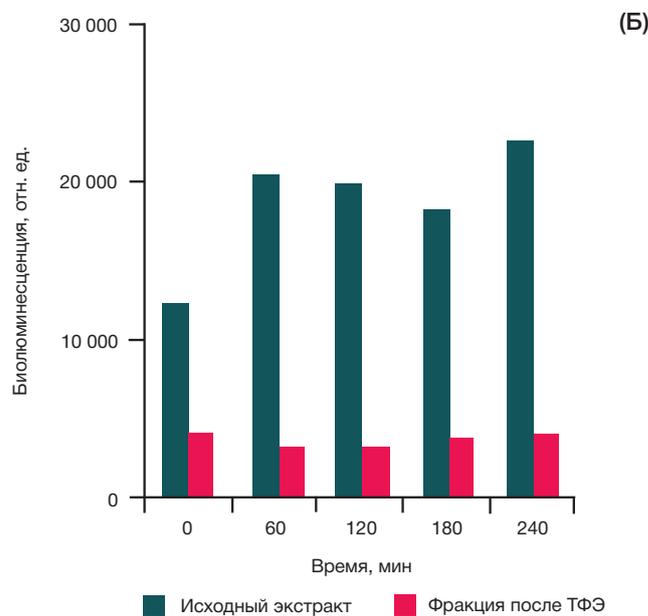
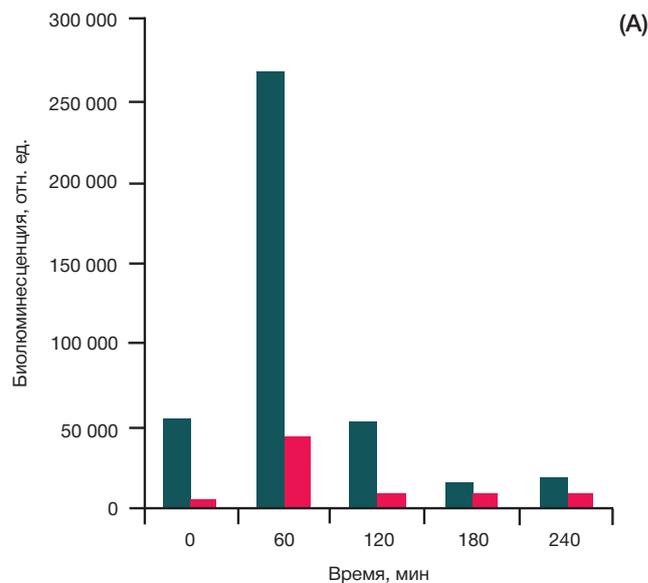


Рис. 3. Зависимость биоломинесценции от времени для экстрактов листьев и ТФЭ фракций, выдержка при 0 °С: (А) — *R. nigrum*; (Б) — *B. pendula*; (В) — экстракты из свежих, мороженых и сушеных листьев *B. pendula*

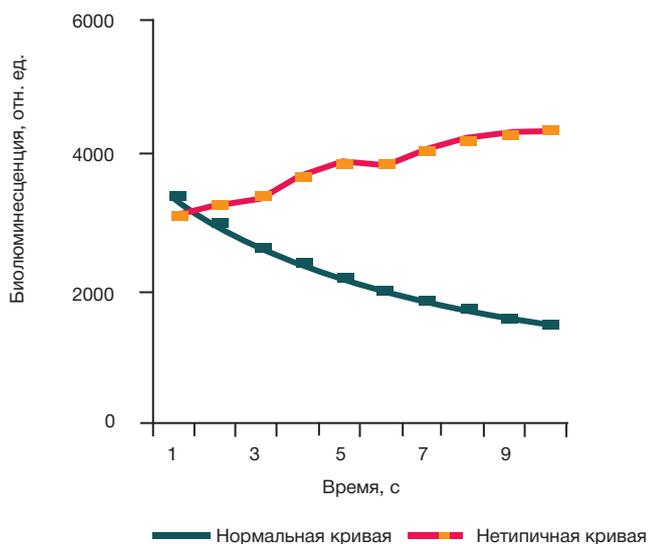


Рис. 4. Кривые измерения биолуминесцентной активности двух фракций *V. pendula*, после ВЭЖХ

неразделенные пики, несколько активных фракций присутствовали в конце хроматограммы. Никакой корреляции между основными хроматографическими пиками и люминесцентной активностью установить было невозможно. Следует отметить, что биолуминесцентная активность, как правило, сопровождалась наличием зеленой окраски фракций (поглощение около 650 нм). Была проведена попытка разделения отдельных фракций на той же колонке, но из-за химической нестабильности биолуминесцентная активность после повторной хроматографии не выявилась.

В следующем опыте была сделана попытка использовать ацетон в качестве компонента подвижной фазы для ВЭЖХ. Ацетон не вполне подходит при спектрофотометрическом детектировании, так как поглощает в нижней области спектра (300 нм и менее). Учитывая имеющиеся данные, мы предположили, что биолуминесцентные субстраты должны поглощать в области более 300 нм, и это позволяет использовать ацетон. Полученная хрома-

тограмма и профиль активности показаны на рис. 7. Результаты измерений указывают на присутствие нескольких активных компонентов. Однако величина активности и соответствующая масса активных компонентов были недостаточно высокими, чтобы перейти к второй ступени хроматографии.

И наконец, кроме вышеперечисленного, для экстракта *P. natans* мы применили двумерную хроматографию с быстрым разделением на полярной колонке и последующим разделением самой активной фракции на колонке с обращенной фазой (рис. 8). Чтобы минимизировать потери вещества и сохранить максимальное количество субстрата, исходные экстракты и фракции перед измерением активности не высушивались. Самая активная фракция, отмеченная между 3 и 3,5 мин хроматограммы на первой колонке, была сконцентрирована до 100 мкл и нанесена на вторую колонку. На хроматограмме второго разделения было выделено два пика в районе 11,5 и 12 мин, но разделение было неполным, а интенсивность люминесценции оказалась низкой.

Была проведена оценка потерь активных соединений в *P. natans* на каждом шаге разделения путем соответствующего измерения БЛ (табл. 5). Рассчитывали общую активность растворов исходных экстрактов и фракций с учетом изменения их объемов. Оказалось, что потери происходили после каждой операции и к концу эксперимента сохранялось лишь 0,2 % исходной величины активности.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изучение образцов листьев растений, содержащих соединения с БЛ активностью, показало, что наша первоначальная гипотеза о присутствии в них гиспидина или 3-гидроксигиспидина не подтвердилась. Во всех случаях для реакции люминесценции не требовалось присутствия НАД(Ф)Н, что указывало на большее сходство активных растительных компонентов, необходимых для люминесценции, с грибным люциферинном, но не с гиспидином. Однако при выборе условий хроматографии, аналогичных тем, что были использованы при выделении грибного

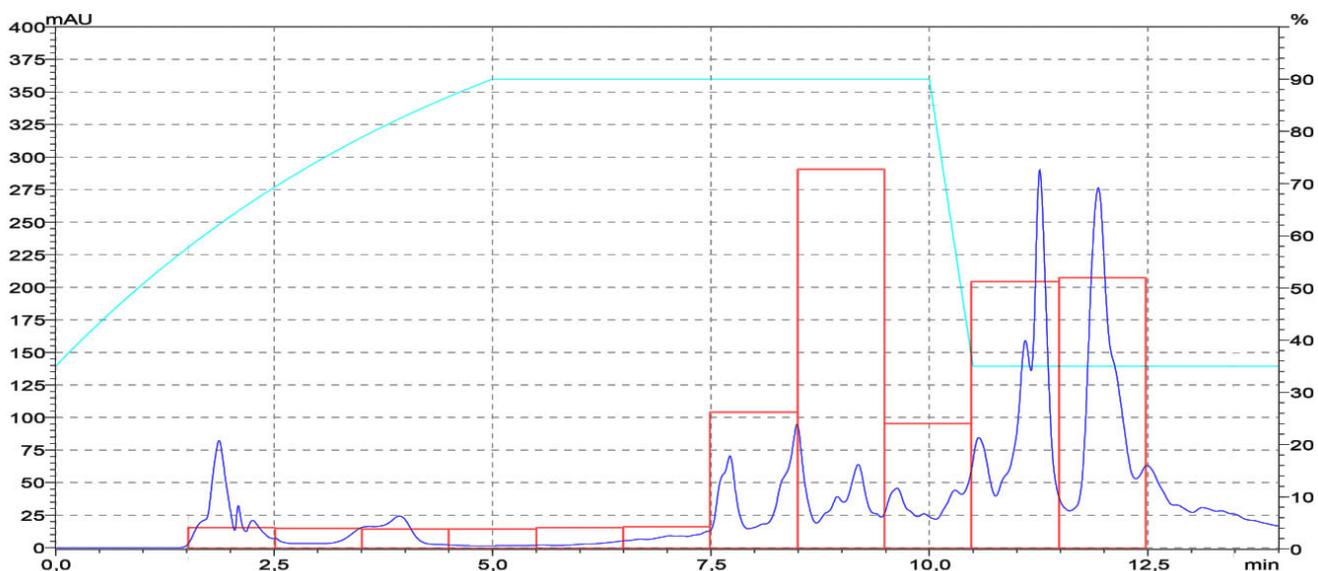


Рис. 5. Разделение экстракта *P. natans* методом ВЭЖХ (УФ-детектор при 430 нм; синяя линия), люминесценция фракций (красная линия) и состав подвижной фазы (голубая линия). Остальное в табл. 2 и 3



Рис. 6. Разделение методом ВЭЖХ и люминесценция экстракта *B. pendula*: (А) — профиль ультрафиолетового/видимого излучения; (Б) — хроматограмма (синяя линия) и биолуминесцентная активность (красная линия). Остальные условия в табл. 2 и 3

люциферина [13], никаких активных компонентов во фракциях ВЭЖХ выявить не удалось.

Наличие многих активных фракций при хроматографическом разделении экстрактов свидетельствует о том, что каждое растение синтезирует не одно, а несколько соединений, являющихся субстратами для люцифера-

зы гриба. Кроме того, различие хроматографических условий для разделения компонентов экстрактов разных растений показывает, что наборы таких соединений весьма разнообразны.

Обнаруженное при выдержке экстрактов на льду аномальное увеличение во времени биолуминесцентной

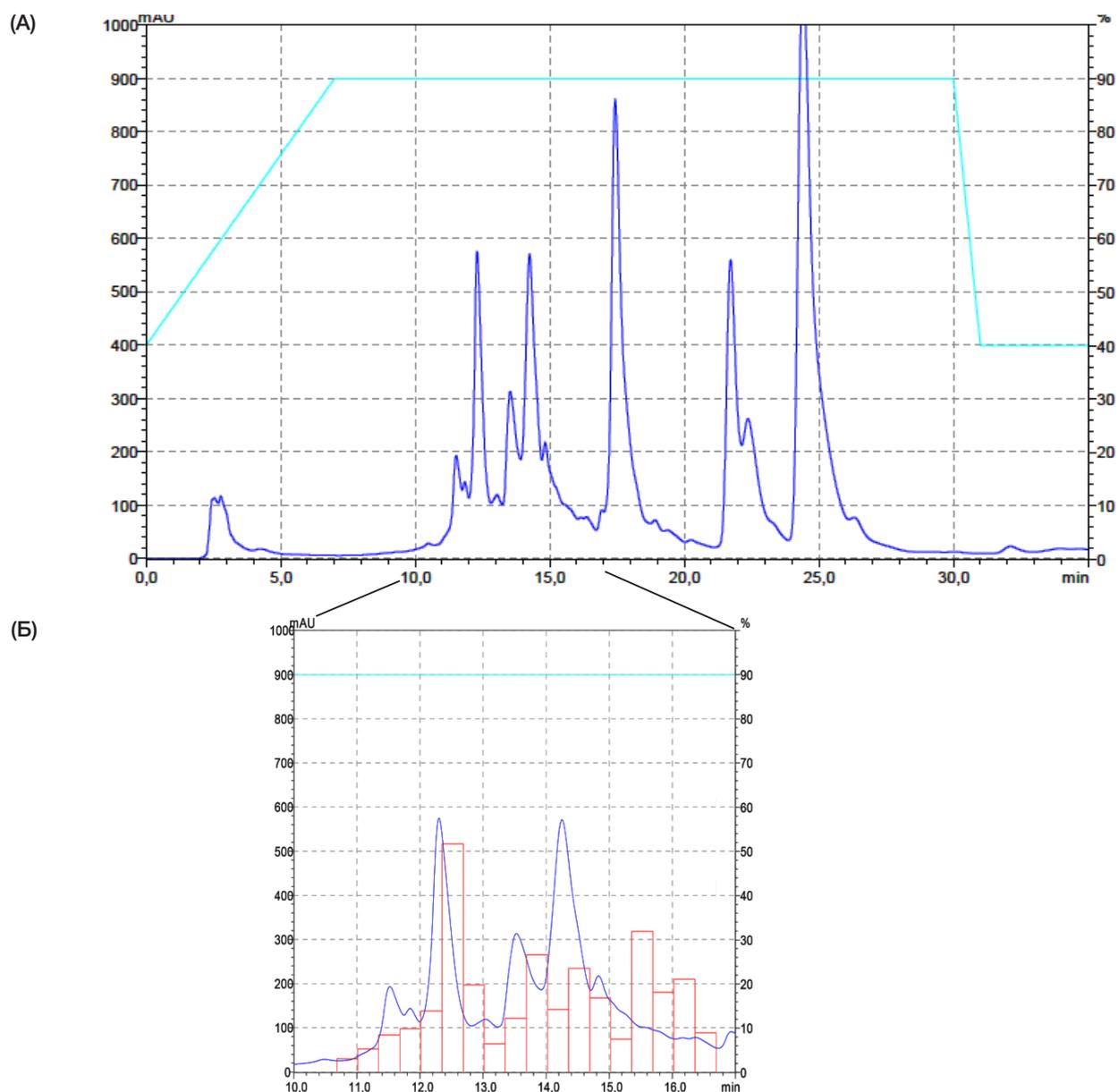


Рис. 7. Разделение экстракта *P. natans* методом ВЭЖХ с использованием ацетона в качестве компонента подвижной фазы: **(А)** — хроматограмма (УФ-детектор при 430 нм; синяя линия), **(Б)** — часть хроматограммы между 10 и 17 мин (синяя линия), люминесценция фракций (красная линия) и состав подвижной фазы (голубая линия). Остальное в табл. 2 и 3

активности органических экстрактов позволяет предполагать, что в них могут протекать реакции, приводящие к снижению концентрации одних активных соединений и повышению концентрации других соединений. Однако ни одного стабильного субстрата обнаружить не удалось, так как люминесценция экстрактов всех 10 растений быстро снижалась при комнатной температуре.

Нами были применены различные модификации методов подготовки экстрактов и их сепарации, чтобы определить, какой вариант позволит удовлетворить противоречивым требованиям максимального извлечения, максимальной сохранности и селективного выделения индивидуального нестабильного соединения из сложной смеси растительного экстракта. В одних случаях экстракты предварительно фракционировали с помощью ТФЭ перед проведением ВЭЖХ, а в других — сразу вводились на хроматографическую колонку. Для дополнительного концентрирования мы пробовали сушить экстракты и повтор-

но растворять в меньшем объеме растворителя, это же касалось растворов хроматографических фракций перед измерением люминесценции; использовали разные органические растворители как компоненты подвижной фазы для ВЭЖХ; применили последовательную хроматографию на колонках разной полярности (двумерную хроматографию).

К сожалению, стабильность всех обнаруженных активных соединений оказалась недостаточной для достижения поставленной цели — выделения какого-либо субстрата в количестве, достаточном для установления его структуры и свойств.

Выводы

В природе не существует биолюминесцентных растений, поэтому их создание методами синтетической биологии

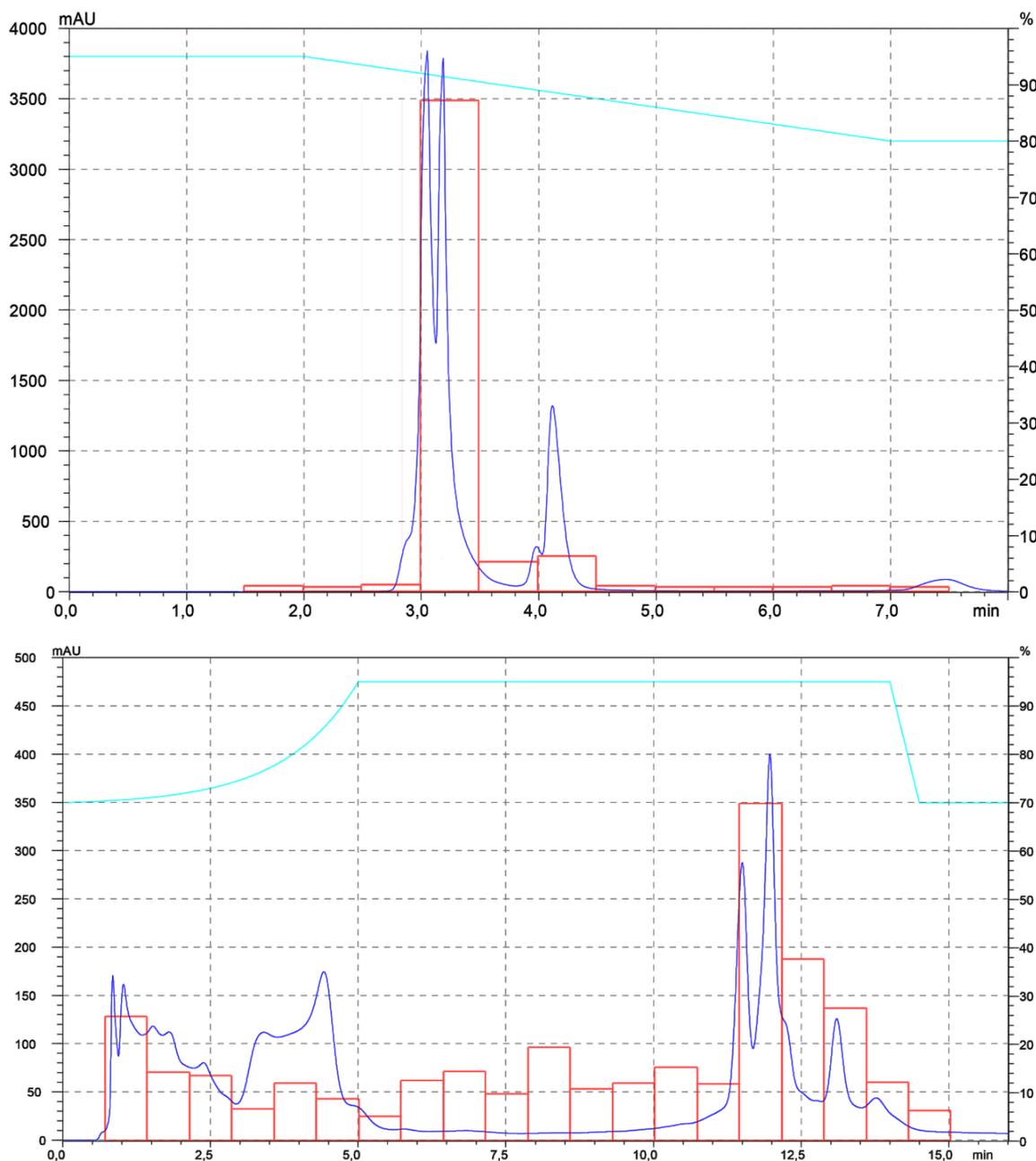


Рис. 8. Разделение экстракта *P. natans* методом двумерной ВЭЖХ: хроматограммы (УФ-детектор при 430 нм; синяя линия), люминесценция (красная линия) и состав подвижной фазы (голубая линия). (А) — колонка с диольной фазой, (Б) — колонка с обращенной фазой. Остальное в табл. 2 и 3

Таблица 5. Потери активности в процессе разделения (к рис. 8)

Фаза	Активность а, отн. ед.	V_1/V_2^*	Общая активность A^{**} , отн. ед.	Общая активность по сравнению с предыдущей, %	Общая активность по сравнению с исходной, %
Экстракция	280 000	100/1	28 000 000	100	100
Хроматография, этап 1	52 000	500/10	260 000	9	9
Фракционирование	45 000	500/10	230 000	87	8
Сушка	27 000	100/3	890 000	39	3
Хроматография, этап 2	6 500	500/10	33 000	37	1
Фракционирование	1 200	500/10	59 000	18	0,2

Примечание. * — V_1 — общий объем раствора, V_2 — объем раствора для измерения; ** — $A = a \cdot V_1/V_2$.

представляет собой интересную задачу. В результате проведенного исследования мы выяснили, что некоторые компоненты растений могут реагировать с люциферазой гриба и реакция сопровождается люминесценцией. Все потенциальные субстраты, содержащиеся в изученных в данной работе растениях, оказались химически нестабильными, что не позволило провести их выделение и охарактеризовать химическую структуру. Тем не менее настоящая работа позволяет сделать следующие выводы, полезные для дальнейших попыток создания автономно люминесцентных растений: люминесцентные субстраты

люциферазы, имеющиеся в экстрактах растительного сырья, не идентичны грибному люциферину (3-гидрокси-гиспидину); изученные виды растений синтезируют множество различных активных соединений. Таким образом, наше исследование можно считать первым шагом в создании люминесцентного растения. По-видимому, наиболее перспективным направлением дальнейшей работы по созданию люминесцентных растений представляется поиск генов, ответственных за синтез 3-гидрокси-гиспидина, а также гена люциферазы грибов, и экспрессия этих генов в трансгенных растениях.

Литература

- Dubois R. Fonction photogenique des pyrophores. C R Seances Soc Biol Fil. 1885; 37: 559–62. French.
- Harvey EN. A History of Luminescence from the Earliest Times Until 1900. Philadelphia, USA: American Philosophical Society; 1957.
- Shimomura O. Bioluminescence: Chemical Principles and Methods. Singapore: World Scientific Publishing; 2006.
- Ow DW, DE Wet JR, Helinski DR, Howell SH, Wood KV, Deluca M. Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. Science. 1986 Nov 14; 234 (4778): 856–9.
- Koncz C, Olsson O, Langridge WHR, Schell J, Szalay AA. Expression and assembly of functional bacterial luciferase in plants. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Jan; 84 (1): 131–5.
- Barnes WM. Variable patterns of expression of luciferase in transgenic tobacco leaves. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Dec; 87 (23): 9183–7.
- Evans A. Glowing Plants: Natural Lighting with no Electricity. Kickstarter campaign [Internet]. [cited 2017 Apr 3]; [about 20 screens]. Available from: <https://www.kickstarter.com/projects/antonyevans/glowing-plants-natural-lighting-with-no-electricity>
- Oliveira AG, Desjardin DE, Perry BA, Stevani CV. Evidence that a single bioluminescent system is shared by all known bioluminescent fungal lineages. Photochem Photobiol Sci. 2012 May; 11 (5): 848–52.
- Airth RL. Characteristics of cell-free fungal bioluminescence. In: McElroy WD, Glass B, editors. Light and Life. Baltimore, Md.: Johns Hopkins Press; 1961. p. 262–73.
- Airth RL, Foerster GE. The isolation of catalytic components required for cell-free fungal bioluminescence. Arch Biochem Biophys. 1962 Jun; 97: 567–73.
- Isobe M, Uyakul D, Goto T. Lampteromyces bioluminescence. II. Lampteroflavin, a light emitter in the luminous mushroom Lampteromyces japonicus. Tetrahedron Lett. 1988; 44: 1169–72.
- Hayashi S, Fukushima R, Wada N. Extraction and purification of a luminiferous substance from the luminous mushroom Mycena chlorophos. Biophysics (Nagoya-shi). 2012 Jul 6; 8: 111–4.
- Purtov KV, Petushkov VN, Baranov MS, Mineev KS, Rodionova NS, Kaskova ZM, et al. The Chemical Basis of Fungal Bioluminescence. Angew Chem Int Ed Engl. 2015 Jul 6; 54 (28): 8124–8.
- Lee IK, Yun BS. Styrylpyrone-class compounds from medicinal fungi *Phellinus* and *Inonotus* spp., and their medicinal importance. J Antibiot (Tokyo). 2011 May; 64 (5): 349–59.
- Tu PTB, Tawata S. Anti-Obesity Effects of Hispidin and *Alpinia zerumbet* Bioactives in 3T3-L1 Adipocytes. Molecules. 2014 Oct 15; 19 (10): 16656–71.
- Be Tu PT, Chompoo J, Tawata S. Hispidin and related herbal compounds from *Alpinia zerumbet* inhibit both PAK1-dependent melanogenesis in melanocytes and reactive oxygen species (ROS) production in adipocytes. Drug Discov Ther. 2015 Jun; 9 (3): 197–204.
- Nguyen BC, Taira N, Tawata S. Several herbal compounds in Okinawa plants directly inhibit the oncogenic/aging kinase PAK1. Drug Discov Ther. 2014 Dec; 8 (6): 238–44.
- Yousfi M, Djeridane A, Bombarda I, Chahrazed-Hamia, Duhem B, Gaydou EM. Isolation and characterization of a new hispolone derivative from antioxidant extracts of *Pistacia atlantica*. Phytother Res. 2009 Sep; 23 (9): 1237–42.
- Benarous K, Bombarda I, Iriepa I, Moraleda I, Gaetan H, Linani A, et al. Harmaline and hispidin from *Peganum harmala* and *Inonotus hispidus* with binding affinity to *Candida rugosa* lipase: In silico and in vitro studies. Bioorg Chem. 2015 Oct; 62: 1–7.
- Wei HA, Lian TW, Tu YC, Hong JT, Kou MC, Wu MJ. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation and oxidative burst in polymorphonuclear neutrophils by caffeic acid and hispidin derivatives isolated from sword brake fern (*Pteris ensiformis* Burm.). J Agric Food Chem. 2007 Dec 26; 55 (26): 10579–84.
- Samappito S, Page J, Schmidt J, De-Eknamkul W, Kutchan TM. Molecular characterization of root-specific chalcone synthases from *Cassia alata*. Planta. 2002 Nov; 216 (1): 64–71.
- Samappito S, Page JE, Schmidt J, De-Eknamkul W, Kutchan TM. Aromatic and pyrone polyketides synthesized by a stilbene synthase from *Rheum tataricum*. Phytochemistry. 2003 Feb; 62 (3): 313–23.
- Sarker SD, Nahar L, editors. Natural Products Isolation. Methods in Molecular Biology, vol. 864. New York: Springer Science+Business Media; 2012.

References

- Dubois R. Fonction photogenique des pyrophores. C R Seances Soc Biol Fil. 1885; 37: 559–62. French.
- Harvey EN. A History of Luminescence from the Earliest Times Until 1900. Philadelphia, USA: American Philosophical Society; 1957.
- Shimomura O. Bioluminescence: Chemical Principles and Methods. Singapore: World Scientific Publishing; 2006.
- Ow DW, DE Wet JR, Helinski DR, Howell SH, Wood KV, Deluca M. Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. Science. 1986 Nov 14; 234 (4778): 856–9.
- Koncz C, Olsson O, Langridge WHR, Schell J, Szalay AA. Expression and assembly of functional bacterial luciferase in plants. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Jan; 84 (1): 131–5.
- Barnes WM. Variable patterns of expression of luciferase in transgenic tobacco leaves. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Dec; 87 (23): 9183–7.
- Evans A. Glowing Plants: Natural Lighting with no Electricity. Kickstarter campaign [Internet]. [cited 2017 Apr 3]; [about 20 screens]. Available from: <https://www.kickstarter.com/projects/antonyevans/glowing-plants-natural-lighting-with-no-electricity>
- Oliveira AG, Desjardin DE, Perry BA, Stevani CV. Evidence

- that a single bioluminescent system is shared by all known bioluminescent fungal lineages. *Photochem Photobiol Sci*. 2012 May; 11 (5): 848–52.
9. Airth RL. Characteristics of cell-free fungal bioluminescence. In: McElroy WD, Glass B, editors. *Light and Life*. Baltimore, Md.: Johns Hopkins Press; 1961. p. 262–73.
 10. Airth RL, Foerster GE. The isolation of catalytic components required for cell-free fungal bioluminescence. *Arch Biochem Biophys*. 1962 Jun; 97: 567–73.
 11. Isobe M, Uyakul D, Goto T. *Lampteromyces* bioluminescence. II. Lampteroflavin, a light emitter in the luminous mushroom *Lampteromyces japonicus*. *Tetrahedron Lett*. 1988; 44: 1169–72.
 12. Hayashi S, Fukushima R, Wada N. Extraction and purification of a luminiferous substance from the luminous mushroom *Mycena chlorophos*. *Biophysics (Nagoya-shi)*. 2012 Jul 6; 8: 111–4.
 13. Purtov KV, Petushkov VN, Baranov MS, Mineev KS, Rodionova NS, Kaskova ZM, et al. The Chemical Basis of Fungal Bioluminescence. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2015 Jul 6; 54 (28): 8124–8.
 14. Lee IK, Yun BS. Styrylpyrone-class compounds from medicinal fungi *Phellinus* and *Inonotus* spp., and their medicinal importance. *J Antibiot (Tokyo)*. 2011 May; 64 (5): 349–59.
 15. Tu PTB, Tawata S. Anti-Obesity Effects of Hispidin and Alpinia zerumbet Bioactives in 3T3-L1 Adipocytes. *Molecules*. 2014 Oct 15; 19 (10): 16656–71.
 16. Be Tu PT, Chompoo J, Tawata S. Hispidin and related herbal compounds from *Alpinia zerumbet* inhibit both PAK1-dependent melanogenesis in melanocytes and reactive oxygen species (ROS) production in adipocytes. *Drug Discov Ther*. 2015 Jun; 9 (3): 197–204.
 17. Nguyen BC, Taira N, Tawata S. Several herbal compounds in Okinawa plants directly inhibit the oncogenic/aging kinase PAK1. *Drug Discov Ther*. 2014 Dec; 8 (6): 238–44.
 18. Yousfi M, Djeridane A, Bombarda I, Chahrazed-Hamia, Duhem B, Gaydou EM. Isolation and characterization of a new hispolone derivative from antioxidant extracts of *Pistacia atlantica*. *Phytother Res*. 2009 Sep; 23 (9): 1237–42.
 19. Benarous K, Bombarda I, Iriepa I, Moraleda I, Gaetan H, Linani A, et al. Harmaline and hispidin from *Peganum harmala* and *Inonotus hispidus* with binding affinity to *Candida rugosa* lipase: In silico and in vitro studies. *Bioorg Chem*. 2015 Oct; 62: 1–7.
 20. Wei HA, Lian TW, Tu YC, Hong JT, Kou MC, Wu MJ. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation and oxidative burst in polymorphonuclear neutrophils by caffeic acid and hispidin derivatives isolated from sword brake fern (*Pteris ensiformis* Burm.). *J Agric Food Chem*. 2007 Dec 26; 55 (26): 10579–84.
 21. Samappito S, Page J, Schmidt J, De-Eknamkul W, Kutchan TM. Molecular characterization of root-specific chalcone synthases from *Cassia alata*. *Planta*. 2002 Nov; 216 (1): 64–71.
 22. Samappito S, Page JE, Schmidt J, De-Eknamkul W, Kutchan TM. Aromatic and pyrone polyketides synthesized by a stilbene synthase from *Rheum tataricum*. *Phytochemistry*. 2003 Feb; 62 (3): 313–23.
 23. Sarker SD, Nahar L, editors. *Natural Products Isolation. Methods in Molecular Biology*, vol. 864. New York: Springer Science+Business Media; 2012.